

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
Departamento de Química Inorgánica



**ESTUDIO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DEL
POLIETILENO, DE LA ALEACIÓN MA 956 Y DE LA
ALUMINA: RESPUESTA DE OSTEÓBLASTOS Y
MACRÓFAGOS FRENTE A LAS PARTICULAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana María Rodrigo Sánchez

Bajo la dirección de las doctoras:
María Eugenia Martínez y María Vallet Regí

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1843-4

ANA MARÍA RODRIGO SÁNCHEZ

**ESTUDIO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DEL
POLIETILENO, DE LA ALEACIÓN MA 956 Y DE
LA ALÚMINA. RESPUESTA DE
OSTEOBLASTOS Y MACRÓFAGOS FRENTE A
LAS PARTÍCULAS**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Inorgánica

Madrid 2000

ANA MARÍA RODRIGO SÁNCHEZ

**ESTUDIO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DEL
POLIETILENO, DE LA ALEACIÓN MA 956 Y DE
LA ALÚMINA. RESPUESTA DE
OSTEOBLASTOS Y MACRÓFAGOS FRENTE A
LAS PARTÍCULAS**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5314018922

MEMORIA
para optar al grado de

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

DIRECTORES:

María Eugenia Martínez (Médico Adjunto Hospital La Paz)
María Vallet Regí (Catedrática Departamento de Inorgánica)

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Inorgánica

Madrid 2000



El presente trabajo ha sido realizado en la Unidad de Metabolismo Oseo (Servicio de Cirugía Experimental) del Hospital Universitario La Paz (Madrid).

Ha sido dirigido por las Dras. M^a Eugenia Martínez (Médico Adjunto del Servicio de Bioquímica) y María Vallet Regí (Catedrática del Departamento de Inorgánica de la Facultad de Farmacia (UCM), con la tutoría de la Dra. M^a Felisa Perpiñan (Prof. del Departamento de Inorgánica de la Facultad de Químicas (UCM).

Ha sido posible llevar a cabo esta Tesis gracias a las becas concedidas por el Ministerio de Sanidad.

Agradecimientos

A las directoras de esta tesis, M^a Eugenia Martínez (Médico Adjunto del Servicio de Bioquímica del Hospital La Paz) y María Vallet Regí (Catedrática del Departamento de Inorgánica de la Facultad de Farmacia, UCM), por haberme dado la oportunidad de formarme en estos años de trabajo.

Al Departamento de Inorgánica por ofrecerme la posibilidad de completar mis estudios de Tercer Ciclo y la colaboración y ayuda brindada.

Al Dr. Munuera, Jefe del Departamento de Traumatología del Hospital La Paz, por su apoyo y su estímulo constante.

Al Dr. Pedro Esbrit y al Dr. Jesús González por sus observaciones y sugerencias durante la elaboración de este trabajo.

A los científicos del CENIM, Dr. Jose Luis González Carrasco, Dr. Jose Ruiz y en especial a la Dra. M^a Lorenza Escudero, por su ayuda inestimable en estos últimos meses, habiéndome demostrado su enorme calidad profesional y personal.

Al personal de Cirugía Experimental y a mis compañeros de laboratorio Marta, Nacho, Laura, Gema y especialmente a Pilar, quien ha estado conmigo desde el principio y me ha demostrado ser una excelente compañera y amiga.

A mis amigos de toda la vida y otros más recientes, por haberme apoyado y haber estado ahí en el momento necesario.

A mi familia, por estar siempre a mi lado y darme ánimos cuando las fuerzas flaquean. A mis tíos y a mis primos por haberme acogido durante este tiempo y hacerme sentir como en casa. Por último, a Paco por ser esa persona tan especial que está siempre a mi lado, por animarme, confiar en mí y estar conmigo en todo momento, especialmente durante la escritura de esta tesis. Por su comprensión y por su ayuda siempre.

Índice

ÍNDICE

•	ABREVIATURAS	
•	INTRODUCCIÓN	1
1.	CONCEPTOS GENERALES DE BIOMATERIALES	1
2.	MATERIALES UTILIZADOS EN ARTROPLASTIAS	2
2.1.	Polímeros	4
2.2.	Cerámicas	5
2.3.	Metales	8
2.4.	Tratamientos superficiales de los metales	11
3.	EL HUESO COMO TEJIDO VIVO	12
3.1.	Composición y tipos de hueso	12
3.2.	Tipos de células óseas y matriz extracelular	13
3.3.	Remodelado óseo	16
3.4.	Fases del desarrollo del fenotipo osteoblástico	17
4.	PROBLEMÁTICA ACTUAL: PARTÍCULAS DE DESGASTE	18
4.1.	Estudios realizados sobre tejidos periprotésicos	19
4.2.	Estudios <i>in vitro</i>	21
4.2.1.	Macrófagos	21
4.2.2.	Fibroblastos	23
4.2.3.	Osteoblastos (OB)	23
4.3.	Estudios <i>in vivo</i>	24
•	OBJETIVOS	27
•	MATERIAL Y MÉTODOS	28
A)	MATERIALES	28
1.	MATERIALES ENSAYADOS	28
2.	MATERIAL DE CULTIVOS CELULARES	29
3.	CÉLULAS PARA LA REALIZACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE OB HUMANOS Y EL COCULTIVO (OB HUMANOS-MACRÓFAGOS DE RATÓN)	31
3.1.	Células osteoblásticas humanas	31

3.2. Células J774	32
B) MÉTODOS	32
1. ANÁLISIS MICROESTRUCTURAL	32
2. ANÁLISIS QUÍMICO	32
3. ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO Y MORFOLÓGICO	33
3.1. Microscopía óptica	33
3.2. Equipo de análisis de imagen	33
3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	34
4. OBTENCIÓN DE LOS EXPLANTES ÓSEOS Y CULTIVOS PRIMARIOS DE OB HUMANOS.	34
4.1. Determinación de la proliferación osteoblástica: Protocolo I.	36
4.2. Secreción del péptido C-terminal del procolágeno tipo I (PICP), fosfatasa alcalina, osteocalcina e interleuquina 6 (IL-6): Protocolo II	37
4.2.1. Obtención del medio celular condicionado en el cultivo primario	37
4.2.2. Determinación de proteínas totales	39
4.2.3. Ensayo para la determinación del PICP	39
4.2.4. Ensayo para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina	39
4.2.5. Ensayo para la determinación de la osteocalcina	40
4.2.6. Ensayo para la determinación de la IL-6 humana	40
4.3. Determinación de la expresión de osteocalcina e IL-6 mediante RT-PCR (transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa): Protocolo III	41
4.3.1. Determinación por RT-PCR de la expresión de osteocalcina y de IL-6	41
4.3.2. Purificación y secuenciación del producto de la PCR	43
5. COCULTIVOS: MACRÓFAGOS DE RATÓN–OB HUMANOS	44
5.1. Cocultivo celular y preparación del medio condicionado	45
5.1.1. Tratamiento de las células osteoblásticas con factor de necrosis tumoral α (TNF- α) murino exógeno	46
5.2. Secreción de citoquinas implicadas en resorción ósea en el cocultivo	46
5.2.1. Ensayo para la determinación del TNF- α murino	47
5.2.2. Ensayo para la determinación de la IL-6 murina	47

5.2.3. Ensayo para la determinación del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) humano	47
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
• RESULTADOS	49
1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MICROESTRUCTURAL DE LOS MATERIALES ENSAYADOS	49
2. CARACTERIZACIÓN GRANULOMÉTRICA Y MORFOLÓGICA DE LOS MATERIALES ENSAYADOS	54
3. CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE OB HUMANOS	58
4. DIFERENCIAS EN LA PROLIFERACIÓN OSTEOBLÁSTICA SEGÚN EL TAMAÑO Y COMPOSICIÓN DE LAS PARTÍCULAS, POLIETILENO O ALÚMINA	59
5. DIFERENCIAS EN LA SECRECIÓN DE PICP, FOSFATASA ALCALINA Y OSTEOCALCINA EN OB HUMANOS SEGÚN EL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS DE POLIETILENO	62
6. DIFERENCIAS EN LA SECRECIÓN DE PICP, FOSFATASA ALCALINA Y OSTEOCALCINA EN OB HUMANOS SEGÚN EL TAMAÑO Y COMPOSICIÓN DE LAS PARTÍCULAS, MA 956 O ALÚMINA	64
7. EFECTOS DE LAS PARTÍCULAS DE POLIETILENO SOBRE LA EXPRESIÓN DE OSTEOCALCINA EN OB HUMANOS EN CULTIVO PRIMARIO	68
8. EFECTOS DE LAS PARTÍCULAS DE POLIETILENO Y ALÚMINA EN LA SÍNTESIS DE IL-6 EN OB HUMANOS EN CULTIVO PRIMARIO	70
9. EFECTOS DE LAS PARTÍCULAS DE ALÚMINA SOBRE LA SECRECIÓN DE VARIAS CITOQUINAS EN EL COCULTIVO OB HUMANO-MACRÓFAGO DE RATÓN	76

• DISCUSIÓN	86
1. CULTIVO PRIMARIO DE OB HUMANOS	86
1.1. Dificultades para su realización	86
1.2. Caracterización de los cultivos de OB humanos	86
2. INFLUENCIA DE LAS PARTÍCULAS DE POLIETILENO, MA 956 Y ALÚMINA SOBRE DIVERSOS MARCADORES DEL FENOTIPO OSTEABLÁSTICO. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	87
3. INFLUENCIA DE LAS PARTÍCULAS DE POLIETILENO Y ALÚMINA SOBRE LA SÍNTESIS DE IL-6 EN OB HUMANOS	95
4. EFECTOS DE LAS PARTÍCULAS DE ALÚMINA EN EL COCULTIVO OB- MACRÓFAGO	98
• CONCLUSIONES	102
• BIBLIOGRAFÍA	104
• ANEXO	

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AMV	Virus de la Myeloblastosis aviar
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas
BSA	Albúmina sérica bovina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNTP	Deoxinucleótidos trifosfato
DRX	Difracción de rayos X
ELISA	Enzimoimmunoensayo
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
Gpa	GigaPascal
HDPE	Polietileno de alta densidad
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleuquinas
IRMA	Ensayo inmunoradiométrico
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
OB	Obsteoblasto
OC	Osteoclasto
PBS	Solución de tampón fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PICP	Péptido C-terminal del procolágeno tipo I
PIIICP	Péptido N-terminal del procolágeno tipo III
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTH	Hormona paratiroidea
RT	Transcripción reversa

SBF	Suero bovino fetal
SEM	Microscopio electrónico de barrido
Tfl	Thermus flavus
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Ticp	Titanio comercialmente puro
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UHMWPE	Polietileno de ultraalto peso molecular
1,25(OH) $_2$ D $_3$	1,25 dihidroxivitamina D $_3$, calcitriol o vitamina D $_3$

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTOS GENERALES DE BIOMATERIALES

Los biomateriales son materiales sintéticos o naturales modificados artificialmente y utilizados para sustituir o reforzar un tejido u órgano [1]. El ámbito de aplicación de los biomateriales es muy extenso y abarca campos tan diversos como la ortopedia, la cirugía cardíaca, la oftalmología, la cirugía estética, la odontología... El progreso de la investigación en este campo ha sido extraordinariamente rápido y son prometedores los numerosos materiales que ya existen en el mercado o cuyo desarrollo se encuentra en una fase avanzada. Para el estudio y desarrollo de los biomateriales es necesario tener en cuenta áreas muy diversas que van desde la ciencia de materiales, pasando por el diseño, las técnicas quirúrgicas, la biología y las distintas especialidades médicas. No obstante, en el desarrollo de cualquier biomaterial se deben tener presentes unas exigencias fundamentales, tales como la biofuncionalidad y la biocompatibilidad.

La **biofuncionalidad** que debe cumplir un determinado biomaterial dependerá de la misión para la que esté diseñado [2]. Por ejemplo, en el caso de los materiales destinados a reemplazar componentes del aparato locomotor, los implantes deben posibilitar una buena transmisión del esfuerzo entre el hueso y el implante [3] y una resistencia mecánica, que aseguren la permanencia del implante a largo plazo [2].

Por otra parte, la **biocompatibilidad** de un biomaterial puede ser definida como su capacidad para ser utilizado en una aplicación específica con una respuesta adecuada del huésped [4]. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el cuerpo humano constituye por naturaleza un entorno químico y biológicamente hostil para cualquier material extraño. Por tanto, las propiedades del material implantado pueden alterarse por acción de los fluidos fisiológicos [5]. Además, todos los biomateriales provocan una respuesta local por parte del huésped que tiene lugar en la interfaz implante-tejido. Atendiendo a la respuesta fisiológica del tejido frente al implante, los biomateriales se pueden clasificar en: biotolerables, casi inertes y bioactivos [6].

Los materiales **biotolerables**, tales como el acero inoxidable, las aleaciones de Co-Cr y el polimetilmetacrilato (PMMA), se caracterizan por la formación de un tejido fibroso que aísla al implante del entorno e impide su estrecha unión con el hueso [7-9].

Los denominados materiales **inertes**, tales como la alúmina y la zirconia [10,11] se caracterizan por el contacto directo con el hueso, fenómeno llamado osteointegración. Branemark y col. [12] definieron osteointegración como “una unión directa estructural y funcional entre el tejido óseo y la superficie del implante”. Sin embargo, la utilización del microscopio electrónico ha demostrado la existencia de una pequeña lámina, constituida principalmente por proteoglicanos, en la interfaz hueso-implante, en vez de la aposición directa del hueso, hipótesis basada en las observaciones realizadas con el microscopio óptico [13-15]. Este tipo de osteointegración también se ha observado en el Ti y sus aleaciones [8,15,16], y constituye una excepción dentro del grupo de biomateriales metálicos. En cualquier caso, en la actualidad se sabe que ningún material es completamente inerte cuando está en contacto con los tejidos vivos. De ahí que se haya comenzado a denominar a la alúmina y a la zirconia como materiales **casi inertes**.

Finalmente, los materiales **bioactivos** presentan una respuesta muy específica en la interfaz hueso-implante caracterizada por una unión química. Ejemplos de materiales bioactivos son las cerámicas bioactivas, dentro de las cuales están los vidrios, las vitrocerámicas y los fosfatos cálcicos como la hidroxiapatita [17-21]. Los materiales bioactivos tienen en común la formación de una capa tipo apatita biológicamente activa en su superficie cuando están en contacto con fluidos fisiológicos [22-24]. Dicha capa es muy similar al componente mineral del hueso por lo que los osteoblastos (OB) pueden proliferar y diferenciarse sobre ella. Esto permite que el tejido óseo crezca en contacto directo con la capa tipo apatita, con lo que se establece una unión directa y fuerte entre el implante y el tejido [25]. Los estudios de Marie y col. [26] han demostrado que aunque la diferenciación de los OB humanos puede promoverse sobre hidroxiapatita, la proliferación se reduce, lo que limita la cantidad de matriz formada sobre este biomaterial *in vitro*.

Por otra parte, se puede establecer una clasificación de los biomateriales en función de la naturaleza química del material: naturales y artificiales. Los artificiales se clasifican a su vez en: polímeros, cerámicas, metales y materiales compuestos [27]. Cada grupo está más indicado para una aplicación en concreto, debido precisamente a las diferencias que presentan en su naturaleza química y en sus propiedades. Esta clasificación, aplicada a los materiales utilizados en clínica ortopédica, será desarrollada en el siguiente apartado.

2. MATERIALES UTILIZADOS EN ARTROPLASTIAS

Los principales materiales utilizados para la fabricación de endoprótesis son las aleaciones metálicas, que generalmente constituyen un sistema de articulación con polietileno de ultraalto peso molecular (UHMWPE) [28]. Aunque inicialmente se utilizaron con este propósito los aceros inoxidable, actualmente las aleaciones de cobalto-cromo-molibdeno (Co-Cr-Mo) y la de titanio-6aluminio-4vanadio (Ti-6Al-4V) constituyen las alternativas más adecuadas [29-32]. Frente al cemento de PMMA, utilizado en la fijación de las prótesis metálicas, las cerámicas de fosfato cálcico, como la hidroxiapatita, están siendo utilizadas como recubrimiento superficial de dichas prótesis para mejorar la respuesta ósea [33,34]. Además, cerámicas como la alúmina y la zirconia, se están utilizando en el sistema cabeza-cotilo, articulando consigo mismas o con polietileno para prolongar la vida útil de la prótesis [10,35]. Además de las propiedades de los materiales, el diseño de los mismos y el método de fijación al sistema musculoesquelético son factores importantes que condicionan la vida y eficacia de una prótesis. En la **Fig. 1** se representa una prótesis de cadera indicando las partes que la constituyen.

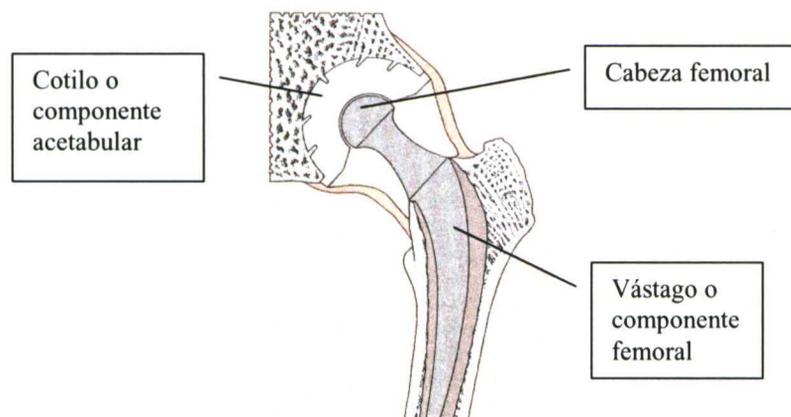


Fig. 1. Representación de una prótesis de cadera.

2.1. Polímeros

Los polímeros tienen dos aplicaciones fundamentales en artroplastia. La primera es como método de fijación entre el implante y el hueso en las prótesis cementadas, es el caso del PMMA. La segunda es como componente de las superficies articulares tanto en el codo, que es la pieza que va alojada en el acetábulo de las prótesis de cadera, como en el platillo tibial en las de rodilla. El material utilizado con este fin es el UHMWPE, en el que nos detendremos a continuación.

- Polietileno de ultraalto peso molecular (UHMWPE)

El polietileno es un polímero de la molécula de etileno, y existen tres grados. El de baja densidad, el de alta densidad y el de ultraalto peso molecular, que con un peso molecular superior a un millón proporciona unas propiedades mecánicas superiores a las de los otros dos. Estas propiedades mejoradas se podrían resumir en: resistencia mecánica, ductibilidad y resistencia al desgaste [36], características que han hecho que las prótesis totales tanto de cadera como de rodilla utilicen el UHMWPE en las superficies articulares. Aunque existen otros diseños cerámica-cerámica, cerámica-metal, o metal-metal, éstos presentan una tasa de uso pequeña en el mercado en relación al par clásico metal/polietileno.

El UHMWPE es un sólido viscoplástico que tiene dos fases las cuales consisten en dominios cristalinos dentro de una matriz amorfa. La fase cristalina consta de cadenas de átomos de carbono plegadas y empaquetadas en láminas de 20 a 50 nm de espesor y de 10 a 50 μ m de longitud. El espaciado interlaminar es de 50 nm [37]. La fase amorfa consiste en cadenas del polímero orientadas al azar enlazadas por cadenas moleculares que conectan entre sí las láminas y proporcionan la resistencia a la deformación mecánica.

Tanto la composición química como el proceso de elaboración del UHMWPE tienen una importancia decisiva a la hora de mejorar las propiedades de resistencia al desgaste de las prótesis [38]. Hoy día se sabe que las partículas de desgaste de UHMWPE producidas en las articulaciones, están directamente relacionadas con el aflojamiento aséptico de las prótesis [39-42]. Se entiende por aflojamiento aséptico la pérdida de

fijación de los componentes de la prótesis al hueso, sin infección asociada, lo que causa su falta de funcionalidad y dolor al paciente, requiriendo en ocasiones una segunda intervención. Debido a ello, se intenta que la generación de partículas en las articulaciones artificiales sea la menor posible. Por ejemplo, se conoce que la esterilización mediante la irradiación gamma en ambiente oxidante aumenta la tasa de desgaste del polímero [43], lo que ha causado el abandono de este método de esterilización por los principales fabricantes desde 1998. Han surgido otras alternativas como la radiación gamma en atmósfera de nitrógeno, de argón o al vacío, la esterilización con óxido de etileno y por un plasma de gas a baja temperatura [44] .

A lo largo de los años han sido numerosas las modificaciones que se han hecho sobre el UHMWPE, con el fin de mejorar su resultado en clínica. Sin embargo, hasta el momento, sólo los polietilenos entrecruzados son los que han mostrado mejoras en el comportamiento en artroplastias de cadera o de rodilla [45]. Estas mejoras se han visto reflejadas en unas menores tasas de desgaste *in vivo* y menor número de focos de osteolisis desarrollados. Las técnicas utilizadas para conseguir los polietilenos entrecruzados comprenden desde la radiación con rayos gamma hasta la utilización de aditivos tales como los peróxidos o los silanos [46]. Por otra parte, la tecnología del entrecruzamiento afecta a las propiedades mecánicas del polietileno, lo cual se manifiesta en una disminución de la tenacidad, la rigidez y la dureza del polímero [47]. Esta aparente contradicción entre menores valores de dureza y mayor resistencia al desgaste no ha sido explicada en la literatura científica.

2.2. Cerámicas

Los materiales cerámicos se caracterizan en primer lugar por su biocompatibilidad, y su gran resistencia a la compresión y al desgaste. Tienen como inconveniente su gran fragilidad, ya que son incapaces de sufrir deformación plástica [48].

Las cerámicas, vidrios y vitrocerámicas incluyen un amplio rango de composiciones inorgánicas no metálicas con distintas microestructuras. Por su comportamiento en el organismo se dividen en: casi inertes, como la alúmina y la zirconia [10,11,35,49], bioactivas como los biovidrios, las vitrocerámicas y las cerámicas de fosfato de calcio

[17-24], ejemplo de las cuales es la hidroxiapatita, y por último las cerámicas biodegradables o reabsorbibles como el fosfato tricálcico [50].

En la actualidad, la alúmina se utiliza como constituyente de las cabezas femorales y/o del componente acetabular y la hidroxiapatita como cubierta para la fijación en la interfaz de vástagos protésicos. Estas cerámicas son las de uso más extendido en cirugía ortopédica, por lo que centraremos nuestra atención en ellas.

- Oxido de aluminio: α -alúmina

El óxido de aluminio se presenta en varias formas polimorfas, dependiendo de sus condiciones de síntesis. La fase utilizada como cerámica casi inerte es la α -alúmina o corindón, de microestructura policristalina. En ella los aniones oxígeno forman un empaquetamiento hexagonal compacto y los cationes aluminio se distribuyen simétricamente en los huecos octaédricos. La composición química de la alúmina de alta pureza está especificada por la ASTM (American Society for Testing and Materials). Según esta normativa, la alúmina para implantes debe tener una pureza superior al 99,5 %, ya que las impurezas se sitúan en las fronteras de grano empeorando sus propiedades mecánicas. Se admite un contenido de impurezas menor de 0,1 % en total entre SiO_2 y óxidos alcalinos, principalmente Na_2O y un tamaño de grano homogéneo e inferior a 7 μm . El tamaño de grano, la porosidad, la densidad y la cristalinidad son variables que afectan a sus propiedades mecánicas. Generalmente a menor tamaño de grano y menor índice de porosidad, mayor es su resistencia [48].

La alúmina fue introducida en 1969 por Boutin [51] en un modelo protésico de cadera en el que tanto cabeza femoral como cotilo estaban constituidos por alúmina. El objetivo era sustituir la combinación clásica polietileno-metal, ya que se conocía que la respuesta biológica a las partículas de desgaste y particularmente a las partículas de polietileno constituía el principal factor responsable de la osteolisis periprotésica y del aflojamiento aséptico [39-42]. Hasta ahora, las series clínicas publicadas del par alúmina-alúmina en cadera han mostrado excelentes resultados a largo plazo en pacientes jóvenes [52]. Se ha comprobado que la tasa de desgaste del par cerámica-cerámica es 4000 veces menor que la del par metal-polietileno [53]. Sin embargo, a pesar de su gran resistencia al desgaste y de ser considerada casi inerte [11,49], su

aplicación clínica es menor del 5 % de las artroplastias totales de cadera y está limitada a Europa. Esto se debe principalmente a que el proceso de manufactura de la alúmina es un proceso de alta tecnología que debe estar bien controlado para proporcionar alúmina de alta calidad y pureza que asegure el éxito clínico. Para ello los componentes de alúmina deben tener un tamaño de grano pequeño, $< 7 \mu\text{m}$, alta densidad y elevada pureza (99,5 %).

- Fosfato cálcico: hidroxiapatita

La parte mineral del hueso y de los dientes consiste en una apatita de fosfato cálcico similar a los cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. El término general “apatita” incluye un conjunto de minerales de composición $\text{A}_{10}(\text{BO}_4)_6(\text{X})_2$ con distintas relaciones Ca/P, que cristalizan en el sistema hexagonal.

A= Ca, Sr, Ba, Cd...

B= P, CO_3 , V, As...

X= OH, CO_3 , O, BO_2 ...

La hidroxiapatita es un fosfato cálcico que incluye hidróxido con una relación Ca/P de 1,67 [54].

La propiedad más interesante de la hidroxiapatita es su excelente biocompatibilidad [25], como resultado de su unión química con los tejidos duros. Desde el punto de vista mecánico posee una baja resistencia a la fractura por lo que ha de ser utilizada en lugares del esqueleto no sometidos a carga. Así, las aplicaciones más importantes de la hidroxiapatita en el campo de la cirugía ortopédica son como rellenos de defectos óseos y en las articulaciones artificiales como recubrimientos de los metales o las aleaciones, los cuales proporcionan las propiedades mecánicas [55]. Su empleo como elemento bioactivo para mejorar la fijación de las prótesis articulares de cadera se inició en la primera mitad de la década de los ochenta [56], precediendo en casi diez años a su introducción en los implantes de rodilla [57].

El proceso de incorporación de la cerámica sobre el metal es complejo, siendo la técnica más utilizada la de pulverización a altas temperaturas [58].

Aunque los resultados iniciales de las prótesis de cadera y rodilla con interfaz hueso-hidroxiapatita son a corto y medio plazo muy alentadores [55,59], las

posibilidades de desprendimiento y delaminación de la capa cerámica, de su reabsorción o degradación y los efectos de sus partículas sobre la fijación de la articulación artificial han de ser tomadas en consideración [60-62].

Con el fin de mejorar las propiedades mecánicas de la hidroxiapatita, se están investigando materiales compuestos mediante la adición de polvos de zirconia [63].

2.3. Metales

Los materiales metálicos, por sus propiedades de alta resistencia y gran ductilidad, son ideales para el soporte de carga, por lo que son ampliamente utilizados para la reparación o reconstrucción del esqueleto. Las aleaciones metálicas más utilizadas en aplicaciones ortopédicas son los aceros inoxidable, las aleaciones de Co-Cr, el Ti y sus aleaciones [28-32,64].

- Aceros inoxidable

El más utilizado es el acero inoxidable 316L (ASTM F-56). Se trata de una aleación con base de Fe con un 17 a 20 % de Cr, un 10 a 14 % de Ni, un 2 a 4 % de Mo y menos de un 0,03 % de C. El Cr genera una película protectora, autorregeneradora de óxido de cromo (Cr_2O_3) que proporciona una gran resistencia a la corrosión. La presencia de aleantes como Ni y Mo y un contenido bajo en C aumentan esta resistencia a la corrosión de los aceros inoxidable [27].

Los aceros inoxidable, especialmente el 316L y el 316LVM (ASTM-F-138), éste último producido mediante fusión al vacío y que mejora la resistencia a la fatiga, tienen su aplicación ortopédica principal en la fabricación de clavos intramedulares, tornillos y placas de osteosíntesis, materiales que pueden ser retirados una vez que termine su misión temporal [65]. La utilización de los aceros inoxidable en prótesis articulares que exigen una larga vida útil es cada vez menor, ya que a pesar de su moderada resistencia a la corrosión, están sujetos a otros tipos de procesos químicos combinados con factores mecánicos como la corrosión bajo tensión [66]. Esto no solo empeora las propiedades mecánicas de la aleación debido a la presencia de fisuras, sino que lleva también a la

liberación de iones metálicos en el tejido circundante y a unas consecuencias biológicas indeseables [67,68].

- Aleaciones de Co-Cr

Existen básicamente dos tipos de aleaciones de Co-Cr, una de ellas es la aleación CoCrMo, que se utiliza para piezas moldeadas, mientras que la otra aleación CoNiCrMo es adecuada para piezas forjadas en caliente [27]. La ASTM recomienda cuatro tipos de aleaciones de Co-Cr para aplicaciones en implantes: (1) la CoCrMo (F75) para moldeo, (2) la aleación CoCrW_{Ni} (F90) para forja, (3) la aleación CoNiCrMo (F562) para forja y (4) la aleación CoNiCrMoWFe (F563) para forja. De ellas solo la F75 y la F562 se utilizan extensamente en la fabricación de implantes. La F75 carece de propiedades mecánicas adecuadas para resistir condiciones de carga y ciclos altos, debido a los defectos inevitables del moldeo, por lo que no es adecuada para fabricar vástagos femorales. La F562, elaborada mediante forjado y compresión isostática caliente es una aleación con menor número de defectos, lo que mejora la resistencia a la deformación en un 80%. Al igual que en los aceros inoxidable, el contenido de Cr de estas aleaciones genera una película pasiva altamente resistente que contribuye sustancialmente a la resistencia a la corrosión, en especial a la corrosión por hendiduras. Los elevados valores de resistencia y límite de fatiga de la aleación F562 forjada, unido a la excelente resistencia a la corrosión y biocompatibilidad, la hacen adecuada para aplicaciones que impliquen tiempos prolongados de servicio bajo flexión y carga, como es el caso de los componentes femorales en las prótesis totales de cadera y de rodilla [28].

- Aleaciones de Ti

El Ti y sus aleaciones son de especial interés en aplicaciones de artroplastia, por su notable biocompatibilidad y su alta resistencia a la corrosión, superior a la de los aceros inoxidable y aleaciones de Co-Cr [29-31,69]. Esta resistencia a la corrosión se debe a la formación de una capa compacta de óxido de Ti en la superficie, que es estable bajo la acción de los líquidos orgánicos.

Existen cuatro grados de materiales de Ti comercialmente puros (Ticp) y que se diferencian en los porcentajes de los elementos contaminantes. El contenido de impurezas como el oxígeno, el hierro y el nitrógeno debe controlarse cuidadosamente, puesto que el oxígeno en particular ejerce gran influencia sobre la ductilidad y la resistencia del material. El Ticp se utiliza en la capa porosa de las prótesis totales no cementadas basadas en Ti [8,16].

La aleación de Ti6Al4V se utiliza ampliamente en la fabricación de implantes [29,31]. La adición de elementos aleantes al Ti le confiere la posibilidad de modificar sus propiedades mecánicas en un amplio rango. Por ejemplo, le permiten aumentar la resistencia a la fatiga de la aleación.

El Ti y sus aleaciones tienen un módulo elástico que es aproximadamente la mitad del de los aceros inoxidable y de las aleaciones de Co-Cr. Su módulo de 100 gigapascuales (GPa) es todavía unas 6 veces mayor que el del hueso cortical (17 GPa). Esta característica de menor rigidez hace aconsejable la utilización de los vástagos femorales de TiAlV en prótesis no cementadas en la cadera [28,70]. De esta forma, se contribuye a disminuir el efecto de protección frente a la carga, que consiste en la aparición de áreas de osteopenia (debilitamiento del hueso), próximas a implantes articulares, al recibir éstos la carga mecánica y reducir el estímulo mecánico necesario para mantener la masa ósea [71-73].

Una desventaja de las aleaciones de Ti es su baja resistencia frente al desgaste [69,74], por lo que no se utilizan como constituyentes de las cabezas femorales y superficies condíleas, dando lugar al desarrollo de las prótesis modulares [32]. En ellas son comunes las cabezas de Co-Cr, con gran resistencia al desgaste y los vástagos de TiAlV en la cadera. De esta forma se aprovecha la menor rigidez de los vástagos de TiAlV y a la vez, sus características como material más bioinerte ante la reacción ósea de fijación en la interfaz. Por otra parte, la abrasión entre el vástago femoral y el cemento es otra fuente importante de partículas de desgaste. Se ha propuesto que la menor rigidez de los vástagos femorales de Ti aumentan el riesgo de fractura del cemento al ser mayor la carga mecánica de éste, si se compara con los componentes de Co-Cr. Una vez fracturado el cemento se puede producir la abrasión de la superficie de TiAlV. Por lo tanto, los componentes femorales de aleaciones de Ti no se deben utilizar en prótesis cementadas. En la rodilla, aunque el efecto de protección sobre la carga no

ha sido un factor a considerar, para evitar el desgaste, se prefieren los componentes femorales de Co-Cr tanto en prótesis cementadas como no cementadas [28,75].

2.4. Tratamientos superficiales de los metales

Los materiales metálicos, como los aceros inoxidable, las aleaciones de Co-Cr y el Ti y sus aleaciones, por sus excelentes propiedades mecánicas, son ideales para soportar carga, pero presentan inconvenientes como son la corrosión y el desgaste y en consecuencia una comprometida biocompatibilidad. Con el fin de aunar las propiedades mecánicas con una buena tolerancia por el organismo, se ha recurrido a la modificación de la superficie de los metales y sus aleaciones mediante diversas técnicas, como son la implantación iónica [76,77] , el depósito de un recubrimiento cerámico casi inerte [78,79] o bioactivo [33,34], y más recientemente proporcionando al metal la capacidad de comportarse como bioactivo por sí mismo [80-82].

La implantación iónica de nitrógeno ha llevado a la mejora de las propiedades de desgaste de las aleaciones de Ti, además de constituir una barrera frente a la liberación de iones. Trabajos recientes han demostrado las buenas propiedades mecánicas y de biocompatibilidad de estos recubrimientos [76,77].

Otro de los recubrimientos que se obtienen sobre sustratos metálicos son las cerámicas casi inertes, concretamente la alúmina [78,79]. En esta línea se ha planteado la posibilidad de utilizar como material para prótesis articulares la superaleación ODS MA 956 con una composición nominal en tanto por ciento 20Cr-5Al-0,5Ti-0,5Y₂O₃, 0,01 C y el resto Fe [83]. Es por tanto un acero inoxidable ferrítico Fe-Cr-Al, de estructura cristalina cúbica centrada en el cuerpo, endurecido adicionalmente por dispersión de óxidos. Este acero inoxidable, tras un tratamiento térmico a 1100°C durante 50-100 h [79,84] , genera en su superficie una delgada capa de α -alúmina muy compacta y bien adherida. En este caso se combinan las buenas propiedades mecánicas del sustrato base [85] con las buenas propiedades frente a la corrosión y al desgaste [86-89] y la buena biocompatibilidad que cabe esperar le confiera la capa de α -alúmina [11].

Otra posibilidad es la utilización de recubrimientos de cerámicas bioactivas, lo que permite la unión directa con el hueso y mejora la fijación inicial del hueso al implante

[33,34]. En la práctica clínica se utilizan metales cubiertos de hidroxiapatita por el método de pulverización a altas temperaturas [55-59]. Esta técnica presenta algunos inconvenientes como son la falta de adherencia del recubrimiento al sustrato y la no uniformidad de la capa depositada. Algunos estudios *in vivo* han mostrado que la pérdida del recubrimiento de hidroxiapatita parece ser progresiva, lo que incrementa el desgaste del polietileno y produce osteolisis y aflojamiento aséptico del implante [60-62].

La modificación superficial que ha surgido más recientemente consiste en dotar al metal o aleación de bioactividad. Se ha demostrado que el TiCP y sus aleaciones e incluso otros metales como el tántalo, son capaces de la unión química al hueso a través de una capa de apatita formada en la superficie del metal en contacto con suero fisiológico. Ésto se consigue mediante un simple tratamiento con NaOH y calor, resultando una capa de titanato o tantalato sódico que induce la nucleación de la apatita en su superficie [80-82].

3. EL HUESO COMO TEJIDO VIVO

El hueso es un tejido conectivo especializado que constituye, junto con el cartílago, el sistema esquelético. Tiene 3 funciones: a) mecánica, b) protectora y c) metabólica. Los constituyentes fundamentales del hueso son un componente orgánico, constituido por células y matriz extracelular y un componente mineral, que sirve como reserva de iones calcio y fosfato, necesarios para mantener la homeostasis sérica, esencial para la vida.

3.1. Composición y tipos de hueso

Hay dos tipos principales de hueso. El hueso cortical o compacto, presente principalmente en los huesos largos, y el hueso trabecular o esponjoso, predominante en las vértebras, extremos de los huesos largos y en las costillas. Aunque la composición celular y de elementos de matriz es la misma en ambos tipos de hueso, tienen diferencias estructurales y funcionales. La principal diferencia estructural es, que por unidad de volumen, el 80-90 % del hueso cortical está calcificado, mientras que en el

trabecular sólo lo está el 15-25 % [90]. Esto conduce a una gran diferencia funcional: el hueso cortical tiene principalmente funciones mecánicas y de soporte, mientras que el hueso trabecular realiza fundamentalmente las funciones metabólicas.

3.2. Tipos de células óseas y matriz extracelular

Los constituyentes fundamentales del hueso son las células y la matriz extracelular. Esta última es particularmente abundante en este tejido y está compuesta por fibras de colágeno, proteínas no colágenas y cristales de hidroxapatita.

- Osteoclastos (OC)

El OC es una célula gigante multinucleada de gran tamaño (50-100 μm), con numerosos lisosomas, ribosomas, y un aparato de Golgi muy desarrollado. La característica morfológica más destacable de estas células es el borde en cepillo, que consiste en invaginaciones y repliegues de la membrana plasmática, que permite el íntimo contacto con la superficie ósea, que inicia la resorción [90].

Proceden de un precursor pluripotencial que comparten con células del linaje monocito-macrófago en la médula ósea [91,92]. El desarrollo de los OC a partir de los precursores hematopoyéticos necesita la presencia de células estromales osteoprogenitoras y células osteoblásticas [93,94]. Además de hormonas sistémicas como la hormona paratiroidea (PTH) y la vitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃), factores locales tales como varias interleuquinas, IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), M-CSF y el factor inhibidor de la leucemia (LIF) estimulan el desarrollo de los OC [92].

- Osteoblastos (OB)

Derivan de células estromales osteoprogenitoras de la médula ósea, células de origen mesenquimal y que contribuyen al mantenimiento de la población osteoblástica al tener una alta capacidad proliferativa [95,96]. Estas células se diferencian en primer lugar a pre-OB y después a OB maduros (**Fig. 2**).

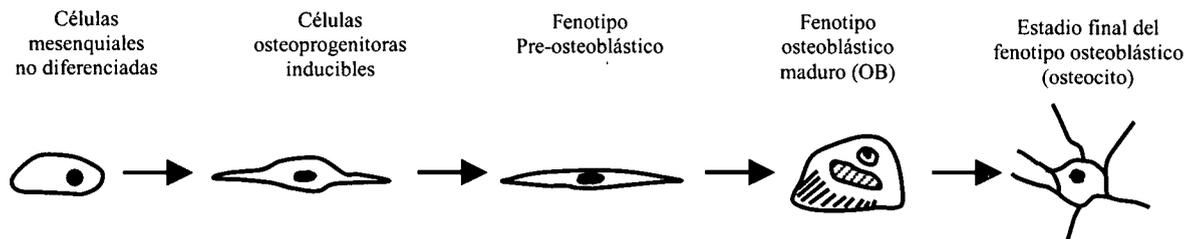


Fig. 2. Linaje de las células osteoblásticas desde precusores estromales hasta el estadio final u osteocito.

Los OB activos, encargados de la producción de los constituyentes de la matriz, son células mononucleares cuboidales de diámetro de 20 a 30 μm , con un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi bien desarrollado. Una vez sucede la mineralización, algunos OB son embebidos dentro de la matriz y se definen como osteocitos, considerados el estadio de diferenciación final de los OB. Los osteocitos se caracterizan por extensiones de la membrana plasmática a través de las cuales se comunican con los OB y también con otros osteocitos. Los OB a su vez, establecen similares contactos célula-célula con las células del estroma. Así, OB, osteocitos y células del estroma están en contacto físico, formando una red de comunicación, que probablemente coordina sus funciones [97].

Los OB, células comprometidas en la formación ósea, tienen las siguientes funciones concretas:

- 1) Son responsables de la producción de proteínas de matriz, como el colágeno tipo I, la osteocalcina, la osteopontina, la osteonectina y la sialoproteína ósea [98-100].
- 2) Producen factores de crecimiento que son almacenados en la matriz, tales como factor de crecimiento transformante β (TGF- β), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I) [101]. Estos factores podrían estar implicados en el acoplamiento entre la formación y la resorción ósea.

- 3) Los OB también mineralizan la nueva matriz formada. Producen cantidades elevadas de fosfatasa alcalina [102], presente en las vesículas de matriz que podrían estar mediando la mineralización [103], aunque fosfolípidos y proteoglicanos podrían ser también importantes en este proceso.
- 4) Además los OB son necesarios para el proceso de resorción [104,105], ya que durante éste, se producen interacciones célula-célula entre OB y OC, a través de la producción de enzimas proteolíticas producidas por los OB y requeridas por los OC para que la resorción ocurra.

Por otra parte, los OB expresan receptores para hormonas sistémicas como la PTH, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, los estrógenos y la hormona del crecimiento, que tienen un importante papel en el acoplamiento entre la formación y la resorción ósea.

- Matriz extracelular.

La matriz extracelular ósea no es metabólicamente inerte sino que se regenera constantemente a lo largo de la vida como consecuencia del remodelado óseo [106]. Esta matriz proporciona elasticidad y flexibilidad al hueso, determinando también su organización estructural.

La matriz ósea está formada por colágeno, principalmente colágeno tipo I, proteínas no colágenas y cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3)_x(\text{HPO}_4)_y(\text{OH})_{0,3}$.

Las proteínas no colágenas incluyen un conjunto numeroso siendo las más abundantes la osteocalcina, que es casi totalmente específica de hueso, y la osteonectina. Otras macromoléculas encontradas en la matriz ósea son los proteoglicanos y las proteínas de adhesión. Estas últimas tienen en común la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp), que es responsable de mediar la adhesión de estas proteínas a las integrinas presentes en las superficies celulares. Estas proteínas de adhesión incluyen fibronectina, osteopontina, trombospondina y sialoproteína ósea [107,108].

Además, la matriz ósea contiene diversos factores de crecimiento como el TGF- β , el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), IGF-I e IGF-II y las BMPs [101,109].

3.3. Remodelado óseo

El tejido óseo está remodelándose constantemente a lo largo de la vida adulta, un proceso iniciado por la resorción de hueso por los OC seguida de la formación de hueso nuevo por los OB [110]. Ambos tipos celulares forman la “unidad de remodelado óseo” denominada así por Frost en 1964 [111], que representa la unidad funcional del tejido. Bajo circunstancias fisiológicas normales, estos dos procesos, resorción y formación, están acoplados, siendo responsables de la renovación del esqueleto, lo que permite el mantenimiento de la integridad estructural y de la función metabólica [112].

La activación osteoclástica inicia el remodelado óseo. Esta activación parece tener lugar a través de interacciones entre las integrinas con proteínas de la matriz ósea como la osteopontina [113], o por señales estimuladoras producidas por células del sistema inmune. Las células del linaje osteoblástico parecen importantes para iniciar la resorción. Los precursores de los OB y de los OC pueden interactuar conduciendo a la diferenciación, migración y fusión de los OC multinucleados [104,105]. Por otro lado, los OB liberan enzimas proteolíticas que producen su retracción, permitiendo el acceso de los OC a la superficie ósea.

Finalizada la fase de resorción, los OB activados forman el hueso nuevo. La apoptosis de los OC precede a la quimiotaxis de los OB al lugar del defecto donde proliferan rápidamente [90]. Uno de los mediadores implicados en ambos fenómenos parece ser el TGF- β , que junto con otros factores locales son liberados de la matriz ósea durante el proceso de resorción e inician el de formación ósea [114,115]. Después de la fase de proliferación tiene lugar la diferenciación de los OB a células maduras caracterizadas por la expresión de colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y osteocalcina. La actividad osteoblástica cesa y la matriz es mineralizada cerrando el ciclo de remodelado (Fig. 3).

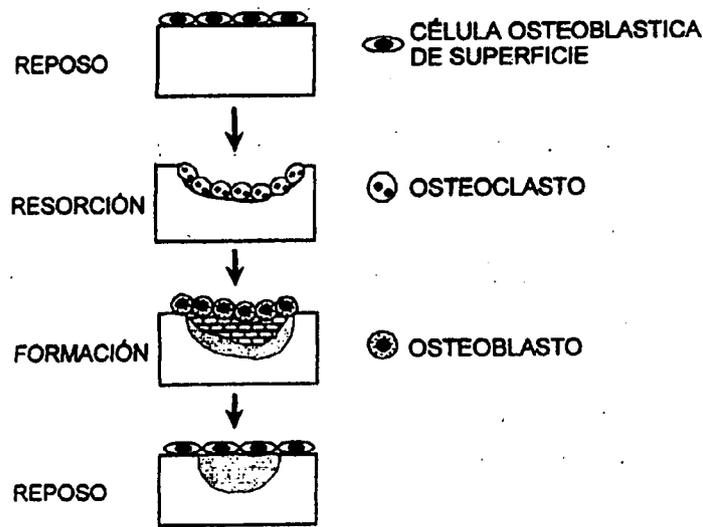


Fig. 3. Esquema del remodelado óseo que sucede gracias al acoplamiento entre OB y OC.

3.4. Fases del desarrollo del fenotipo osteoblástico

Estudios *in vitro* ponen de manifiesto cuatro fases bien diferenciadas durante el desarrollo osteoblástico [116]: proliferación celular, maduración de la matriz extracelular, mineralización y apoptosis (Fig. 4).

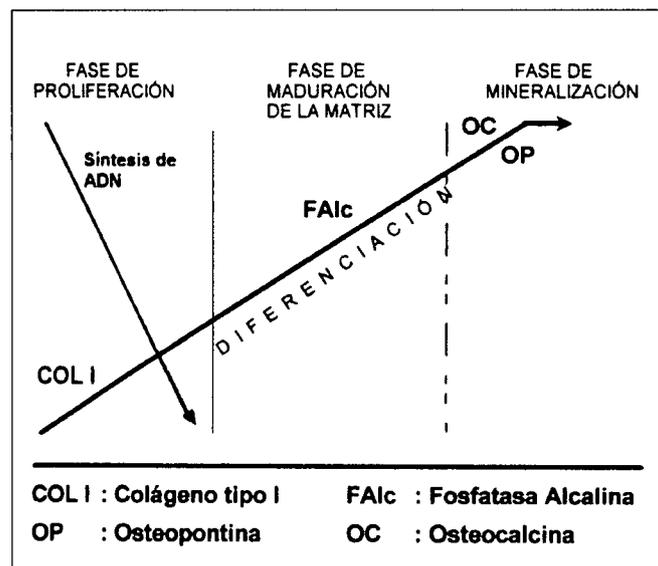


Fig. 4. Fases del desarrollo del fenotipo osteoblástico. Durante la primera fase se produce una elevada proliferación celular y una elevada síntesis de colágeno tipo I (COL I), en la segunda fase se alcanzan los niveles máximos de fosfatasa alcalina (FAIc) y, por último, en la fase de mineralización se produce la máxima expresión de osteocalcina (OC) y osteopontina (OP).

Durante la etapa de proliferación existe una expansión de la población celular osteoblástica y tiene lugar la biosíntesis de colágeno tipo I que es liberado a la matriz ósea. Finalizada la fase proliferativa, comienza la expresión de proteínas implicadas en la organización de la matriz, como la fosfatasa alcalina, para hacerla competente a la mineralización. La fase de mineralización ósea implica el depósito ordenado de cristales de hidroxiapatita en la matriz de colágeno. En esta etapa se incrementa la expresión de genes como la osteocalcina, la sialoproteína ósea y la osteopontina, paralelamente a la acumulación de mineral. Por último, tiene lugar la apoptosis celular, fase en la que se produce una elevada expresión de colagenasa.

4. PROBLEMÁTICA ACTUAL: PARTÍCULAS DE DESGASTE.

La pérdida periprotésica de hueso asociada a la osteolisis, con o sin aflojamiento aséptico, es la causa de fracaso más común de las artroplastias totales [117-119]. Aunque factores mecánicos, un mal posicionamiento de la prótesis, así como el diseño de la misma, el proceso de envejecimiento y el remodelamiento adaptativo pueden contribuir a la pérdida de hueso después de una artroplastia, se considera que la reacción biológica a las partículas de desgaste es el principal mecanismo implicado [120].

Las partículas de desgaste son generadas en varias localizaciones en una artroplastia total por diferentes mecanismos, pudiendo alojarse en sitios diversos [121]. Dichas partículas se producen fundamentalmente por procesos de fricción en la articulación artificial. El desgaste puede tener lugar por varios mecanismos. Por ejemplo, en el desgaste por tercer cuerpo, partículas de hueso, de metal, poliméricas o de otros componentes de la prótesis quedan atrapadas dentro de la articulación y en la interfaz de los componentes de las prótesis modulares. También se produce desgaste en las interfaces no articulantes debido a la abrasión del hueso con el vástago, sobre todo si el vástago es de TiAlV. Las partículas generadas pueden quedar atrapadas en la articulación o emigrar por la membrana fibrosa a la parte inferior del vástago [41]. También pueden ser distribuidas por los líquidos extracelulares y alcanzar el riñón, el bazo, los pulmones y otros órganos [122].

4.1. Estudios realizados sobre tejidos periprotésicos

Los estudios realizados sobre los tejidos periprotésicos retirados de pacientes tras el fracaso de las prótesis o “postmortem” permiten obtener información acerca de las propiedades del tejido en el momento de la retirada, pero no explican los procesos que tienen lugar antes de este punto. Estos estudios han apoyado la hipótesis de que el tejido membranoso que se forma alrededor de las prótesis aflojadas desempeña un importante papel en la osteolisis.

La implantación de un material extraño viene acompañada de la formación de una cápsula o membrana fibrosa [7-9], excepto cuando sucede la osteointegración [8,12-16].

Las características del tejido alrededor de prótesis no osteointegradas pueden variar ampliamente. Desde delgadas membranas fibrosas constituídas por fibras colágenas y orientadas paralelamente a la superficie del implante, pocas células y pocas partículas, en pacientes asintomáticos con implantes estables [7-9], hasta las membranas interfaciales de las prótesis aflojadas, que aparecen radiológicamente como líneas claras entre el implante y el hueso y con una composición celular, histológica y bioquímica de características similares a las de la membrana sinovial [123]. Los tejidos de las prótesis aflojadas, especialmente de aquéllos con osteolisis, contienen un gran número de fibroblastos, macrófagos, células gigantes de cuerpo extraño, linfocitos en menor número, numerosos vasos sanguíneos y partículas de desgaste de los materiales que componen las prótesis [119,124,125]. Han sido numerosos los estudios en los que se ha demostrado que las membranas procedentes de pacientes con prótesis aflojadas en cultivo elaboran IL-1, IL-6, prostaglandina E₂ (PGE₂), colagenasa, gelatinasa, TNF- α [123,126-128], factores capaces de producir resorción ósea *in vivo* e *in vitro* [129].

Estos productos celulares, a través de complejos mecanismos, causan osteolisis periprotésica, al exceder la capacidad reparativa de los tejidos fibroso y óseo, dando como resultado el aflojamiento de la prótesis al hueso. Inicialmente, esta reacción histológica adversa se atribuyó a las partículas del cemento de PMMA, ya que fue encontrado en áreas focales de lisis tanto en prótesis estables como aflojadas, llevando al concepto de enfermedad del cemento [130]. Para evitar esta complicación se propuso la fijación sin cemento. Sin embargo la osteolisis periprotésica también sucede en las

prótesis no cementadas, tanto en implantes estables como aflojados, lo que ha conducido a utilizar un término más general: enfermedad de la partícula [42,119].

La mayoría de las partículas encontradas en las membranas periprotésicas están en el rango micrométrico o submicrométrico y son apenas visibles al microscopio óptico [39-42,131-133]. En casos de desgaste severo, pueden aparecer partículas grandes de polietileno de varias decenas de micras de longitud. Las partículas de tamaño no fagocitable son rodeadas de células gigantes, mientras que las partículas pequeñas son fagocitadas por los macrófagos. La cantidad de partículas de desgaste, predominantemente partículas de polietileno, ha sido relacionada con el número de macrófagos en tejidos retirados de prótesis aflojadas [131,132]. Además, la pérdida de hueso y la resorción ósea histológica parecen correlacionarse con la existencia en los tejidos periprotésicos de macrófagos que contienen partículas [134].

Por otra parte, la utilización de las técnicas de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ* han reforzado la asociación entre los macrófagos de las membranas periprotésicas y la producción de enzimas y citoquinas inductoras de osteolisis como respuesta a las partículas de desgaste [127,135,136]. Así, Jinarek y col. [135], utilizando estas técnicas, demostraron que los macrófagos eran las células predominantes en las membranas interfaciales de las prótesis aflojadas, que contenían partículas de desgaste, y que estas células expresaban altos niveles de ARNm de la IL-1 β y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La asociación de estas citoquinas con los macrófagos, proporcionó una evidencia directa de que estas células tienen un importante papel en el reconocimiento del material extraño y en la liberación de mediadores inflamatorios. En el modelo de Jinarek y col. [135] estos mediadores modularían la actividad de células vecinas (fibroblastos y OB), que serían responsables de mediar la osteolisis focal.

Mientras que la mayoría de los trabajos realizados sobre los tejidos periprotésicos han estudiado únicamente la membrana que rodea la prótesis aflojada, centrando su atención en los efectos de las partículas sobre la resorción ósea, otros como Kadoya y col. [134] han estudiado también la superficie ósea adyacente a la membrana interfacial, observando que la resorción estaba aumentada 20 veces y que la formación ósea estaba reducida a la mitad. Por lo tanto, la posibilidad de que la función osteoblástica pueda verse afectada como consecuencia de la presencia de partículas de desgaste en las

prótesis aflojadas, es una hipótesis a considerar a la hora de comprender la reacción del tejido a dichas partículas.

4.2. Estudios *in vitro*

Han sido numerosos los estudios *in vitro* que se han centrado en los macrófagos y en las partículas de desgaste y menos los que han estudiado otras células como fibroblastos y OB. Los estudios *in vitro* permiten reducir las variables inherentes a los tejidos periprotésicos, tales como la variedad de tamaños y composiciones de las partículas y tipos celulares.

4.2.1. Macrófagos

Las células utilizadas en estos estudios han sido líneas celulares de macrófagos transformadas o inmortalizadas (P388D1, J774, RAW 267), macrófagos peritoneales de ratón y rata, y monocitos humanos de sangre periférica [137-139]. Diferentes partículas estimulan la liberación de varios mediadores proinflamatorios como TNF- α , PGE₂, IL-1, IL-6, quimioquinas, aniones superóxido y derivados del óxido nítrico [140-145]. Estas sustancias son capaces de modular la formación y la resorción ósea, y potencialmente podrían desempeñar un papel destacado en determinar las propiedades de la interfaz, incluyendo el remodelado del hueso adyacente a la prótesis [129]. Variables críticas en cuanto a la respuesta celular incluyen la composición de la partícula, la concentración, el tamaño, la forma, la topografía, el área superficial y el volumen.

Estudios *in vitro* utilizando distintas concentraciones de partículas de cemento, polietileno, latex y zimógeno mostraron que la fagocitosis de estas partículas por macrófagos peritoneales de ratón condujo a una liberación variable de PGE₂ y Ca⁴⁵ de explantes óseos. Las partículas más activas eran las de zimógeno y las de menor actividad las de latex, teniendo actividad intermedia las partículas de polietileno y de cemento [140]. En otro estudio Haynes y col. [138], utilizando partículas de Co-Cr y partículas de la aleación de Ti, encontraron que las partículas de Co-Cr eran citotóxicas, causando muerte celular, mientras que su capacidad de liberar mediadores inflamatorios

estaba limitada. Sin embargo, las partículas de la aleación de Ti eran menos tóxicas pero indujeron la síntesis y liberación de niveles elevados de varios mediadores inflamatorios como la IL-1, IL-6, PGE₂ y TNF- α . Shanbhag y col. [137] estudiaron la capacidad estimuladora de las partículas de TiAlV, Ticip y UHMWPE retiradas de los tejidos interfaciales y fabricadas en el laboratorio, encontrando que las partículas de TiAlV inducían la mayor liberación de PGE₂, IL-1 β e IL-6 en los monocitos humanos de sangre periférica. Las partículas de Ticip y las de UHMWPE fabricado producían la liberación de varios mediadores, pero en menor grado, mientras que las partículas de UHMWPE retiradas de las membranas interfaciales tenían una capacidad estimuladora menor.

Además de las variables correspondientes a las partículas, como composición, tamaño, dosis, etc..., diferentes poblaciones de macrófagos pueden responder de forma distinta a la misma señal. En este sentido Glant y Jacobs [139] demostraron que tres poblaciones de macrófagos (P388D1, IC21 y macrófagos peritoneales) liberaban PGE₂ e IL-1, y el medio condicionado por estas células inducía la resorción ósea en distinto grado cuando eran expuestas a PMMA, poliestireno y a partículas de Ti.

Horowitz y col. [146,147] han enfatizado la importancia del TNF- α como principal mediador liberado en respuesta a PMMA por los macrófagos, que además de ser un factor resorptivo *per se*, modula la liberación de otros factores resorptivos por los OB, tales como IL-6, GM-CSF y PGE₂ [147].

En otro estudio posterior, Horowitz y col. investigaron el efecto del polietileno sobre el cocultivo macrófago-OB [148]. Encontraron que la exposición macrófagos aislados a partículas de polietileno conducía a la liberación de TNF- α y PGE₂ y que en el sistema de cocultivo macrófago-OB, los niveles de PGE₂ e IL-6 eran mucho más elevados. Así, Horowitz propone que el mecanismo por el cual las partículas de polietileno estimularían la resorción ósea podría implicar un mecanismo mediado por OB y macrófagos, caracterizado por la liberación de IL-6 y PGE₂.

Como vemos, en la literatura existe abundante información acerca de que los macrófagos activados por partículas de desgaste de varios tipos pueden producir factores implicados en la resorción ósea. Además, se han descrito interacciones complejas entre macrófagos, fibroblastos, OB y OC [148-151]. Sin embargo, se ha

observado que estas partículas también tienen efectos directos en otras células en cultivo, incluyendo fibroblastos y OB [152].

4.2.2. Fibroblastos

Se piensa que el fibroblasto es la célula primariamente responsable de la síntesis y deposición de colágeno, que proporciona la integridad estructural al tejido membranoso adyacente a la prótesis. Además, los fibroblastos pueden producir citoquinas y enzimas que influyen en el remodelado [153] y, aunque los fibroblastos comprenden alrededor de un 30 % de las células de las membranas de implantes fracasados, se ha investigado muy poco acerca de su posible papel en la osteolisis [154-156]. Malanpaz y col. [154] demostraron que los fibroblastos expuestos a partículas de la aleación de Ti se activaban liberando mediadores proinflamatorios que influyen en el metabolismo óseo. Dicha activación acoplada a la respuesta biológica a las partículas de desgaste de los macrófagos, podría tener un efecto sinérgico en la resorción ósea patológica.

4.2.3. Osteoblastos

Al igual que en el caso del fibroblasto, el OB ha sido una célula muy poco estudiada en cuanto a su posible papel frente a la respuesta a las partículas de desgaste. Como es bien conocido, el hueso es un tejido vivo, que está constantemente remodelándose. Este proceso de remodelado requiere un equilibrio entre la formación ósea y la resorción. Una disminución en la formación de hueso, con o sin incremento en la resorción, podría desequilibrar el proceso de remodelado óseo dando lugar a la pérdida de hueso periprotésico u osteolisis [71,72,90].

Trabajos previos han analizado los efectos *in vitro* de partículas de determinadas composiciones y tamaños en algunos marcadores del fenotipo osteoblástico, como colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y osteocalcina, y en la producción de determinados factores locales relacionados con resorción ósea, entre ellos la IL-6 y la PGE₂ [133,157-167].

Los efectos hallados dependen de las características de las partículas (composición, tamaño, etc...) y del tipo de población osteoblástica estudiada.

Varios autores han apoyado la hipótesis de que la actividad osteoblástica es modulada por las partículas de diferentes biomateriales, poliméricos o metálicos. Así, partículas de Co inhibieron la actividad de la fosfatasa alcalina, la síntesis de colágeno y la producción de osteocalcina en dos líneas celulares osteoblásticas humanas (SaOS-2 y MG63) [159]. Asimismo, partículas de PMMA inhibieron el crecimiento celular y la síntesis de colágeno, mientras la producción de osteocalcina y de IL-6 se incrementó en OB humanos procedentes de hueso trabecular [158]. Yao y col. [160] demostraron que las partículas de Ti disminuyeron la síntesis de colágeno tipo I y tipo III en MG63. Sun y col. [163] han observado en OB de rata, que las partículas de hidroxiapatita inducen una disminución en la población celular y un incremento en la liberación de PGE₂ de forma dependiente del tamaño de la partícula. Así, las partículas más pequeñas son las que producen un efecto mayor.

Recientemente se ha demostrado que las partículas de Ti-Cp, Ti-Al-V y Co-Cr afectan en distinto grado, según la composición química, la proliferación, la actividad de la fosfatasa alcalina y la producción de PGE₂ en células MG63 [162].

En general los cambios observados en los trabajos mencionados están relacionados con una disminución de la actividad osteoblástica, que podría tener efectos negativos en la formación ósea adyacente al implante. Además, el aumento en la producción de mediadores locales como la IL-6 y la PGE₂ podrían estimular a los OC promoviendo el proceso de resorción ósea.

Estos hallazgos implican una alterada función osteoblástica en cuanto a la pérdida de masa ósea asociada con el aflojamiento aséptico; por tanto, un modelo más completo de este proceso debería tener en cuenta, además de la resorción osteoclástica, la posibilidad de que la función osteoblástica también pueda estar afectada.

4.3. Estudios *in vivo*

En cuanto a los estudios *in vivo*, han sido numerosos los modelos animales que han demostrado la fagocitosis del polietileno, del PMMA o de las partículas metálicas por los macrófagos, dando lugar a la activación de los mismos y a la formación del tejido granulomatoso [168-172]. La reacción específica depende del tipo de material, la concentración y las características de la partícula, tales como tamaño, área superficial,

topografía, superficie química y otras propiedades. Goodman y col. [168] demostraron que las partículas de PMMA o UHMWPE pueden estimular la formación de granulomas peripróticos en cavidades óseas. Las partículas produjeron una reacción fibrohistiocítica y de células gigantes que era similar al tejido de alrededor de las prótesis aflojadas. Por el contrario, los mismos materiales en forma de bloque producían una delgada membrana fibrosa.

Howie y col. [169] observaron resorción ósea alrededor de implantes cementados en ratas después de realizar inyecciones de partículas de polietileno de tamaño no fagocitable.

Por otro lado, Goodman y col. [170] en otro de sus estudios *in vivo* en conejos, describieron que las partículas de polietileno disminuían la formación neta de hueso e incrementaban el número de OC en las superficies óseas. Sin embargo, el mismo estudio reveló que las partículas de Co-Cr disminuían la formación neta de hueso sin incrementar la resorción.

En resumen, mientras la resorción ósea parece contribuir a la pérdida de hueso asociada con el aflojamiento aséptico de los implantes en respuesta a las partículas de desgaste [123,143,155,166,169], la disminución de la formación ósea podría desempeñar un papel importante en este proceso [134,165,170]. Algunos de los efectos sobre los OB podrían ser indirectos a través de la producción de mediadores inflamatorios por monocitos y macrófagos [146-148]. Sin embargo, las partículas de desgaste podrían entrar en contacto con los OB, ya que la interfaz hueso-implante proporciona el acceso directo de las partículas al tejido periprotésico, permitiendo el contacto directo de las partículas con los OB [41].

Con objeto de minimizar las partículas de desgaste, los esfuerzos se han centrado en la mejora y desarrollo de nuevos biomateriales y diseño de las prótesis. En este sentido, la nueva aleación MA 956 ha sido propuesta como biomaterial, porque combina las buenas propiedades del núcleo metálico [85] con la excelente resistencia frente a la corrosión característica de la alúmina [86-89]. La posible aparición de partículas del recubrimiento cerámico y más improbablemente del sustrato metálico es un hecho a considerar por lo que exige evaluar su biocompatibilidad.

Por otra parte se considera que el polietileno es uno de los principales causantes del fracaso protésico asociado al aflojamiento aséptico [39-42,131-133]; la alúmina, en

cambio, ha sido considerada casi inerte [11,49] y muchos investigadores la han recomendado como material de referencia cuando se hacen estudios de biocompatibilidad.

Así, el objetivo principal de esta tesis es analizar la respuesta de las células osteoblásticas humanas en cultivo primario frente a las partículas de polietileno, de la aleación MA 956 y de su capa de alúmina y la influencia del tamaño de las mismas, como forma de estudiar la biocompatibilidad de estos materiales *in vitro*. Asimismo, utilizaremos un modelo de cocultivo heterólogo de macrófagos de ratón y OB humanos como sistema más novedoso para estudiar la interacción de ambos tipos celulares y su respuesta a las partículas de alúmina.

Teniendo en cuenta estos precedentes se proponen a continuación los objetivos concretos de esta investigación.

Objetivos

OBJETIVOS

- 1) Estudiar los efectos del tamaño y de la composición de las partículas, polietileno ó alúmina, sobre la proliferación de OB humanos en cultivo primario.
- 2) Evaluar la influencia del tamaño de las partículas de polietileno sobre la secreción de diversos marcadores del fenotipo osteoblástico en presencia o ausencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en OB humanos en cultivo primario.
- 3) Estudiar la influencia del tamaño y de la composición de la partícula, MA 956 y alúmina, sobre la secreción de diversos marcadores del fenotipo osteoblástico, en presencia o ausencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en OB humanos en cultivo primario.
- 4) Determinar el efecto de las partículas de polietileno sobre la expresión de osteocalcina, tanto en ausencia como en presencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en las células osteoblásticas humanas.
- 5) Evaluar el efecto de la composición de las partículas, polietileno o alúmina, sobre la síntesis de IL-6 por los OB humanos.
- 6) Determinar el efecto de las partículas de alúmina en la secreción de diversas citoquinas resorptivas en el cocultivo compuesto por macrófagos de ratón y OB humanos.

Material y Métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

A) MATERIALES

1. MATERIALES ENSAYADOS

Los materiales utilizados en el presente estudio fueron los siguientes: polietileno, aleación MA 956 y alúmina, todos ellos en forma de partícula con distribuciones de tamaño variable.

Se utilizó polietileno con procedencias y granulometrías distintas, con las siguientes denominaciones:

- Polietileno de alta densidad (HDPE) < 5 μm (Polysciences, Eppelheim, Germany).
- Polietileno de ultraalto peso molecular (UHMWPE) < 30 μm , obtenido por tamización del polietileno GUR128 (Hoechts AG, Frankfurt, Germany).
- UHMWPE < 80 μm (Hoechts, Frankfurt, Germany).
- UHMWPE < 160 μm (Howmedica, Rutherford, N. J., USA).

Todos ellos serán denominados a lo largo de este trabajo con el término general de polietileno.

Las partículas de la aleación de MA 956 fueron suministradas por INCO Alloys International (Hereford, U.K) y preparadas por tamización del polvo aleado mecánicamente. Fueron ensayadas según dos tamaños distintos < 10 y < 80 μm . La composición nominal de las partículas de MA 956 en % en masa es la siguiente: 74,5Fe-20Cr-4,5Al-0,5Ti-0,5Y₂O₃ [83].

Se utilizó alúmina de cuatro tamaños de partícula distintos:

- Alúmina < 5 μm (Alcoa, Barcelona, España)
- Alúmina < 10 μm (Aluminio Español S. A., Lugo, España)
- Alúmina < 80 μm de dos procedencias distintas, (a) Baker Chemical (Phillipsburg, N. J., USA) y (b) Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas (CENIM).
- Alúmina < 160 μm (CENIM).

Las partículas fueron esterilizadas con alcohol isopropílico y fueron secadas en la campana de flujo laminar bajo la luz ultravioleta.

2. MATERIAL DE CULTIVOS CELULARES

- Materiales de uso común

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco
- Suero bovino fetal (SBF)	Gibco
- Antibióticos (penicilina/estreptomicina)	Gibco
- Tripsina	Gibco
- Placas, frascos de cultivo y material de plástico	Falcon y Nunc
- Insertos para cultivo celular	Falcon
- PBS (tampón fosfato salino)	Sigma
- Inhibidores de proteasas (pepstatina, aprotinina, PMSF y bacitracina)	Sigma
- Albúmina bovina sérica (BSA)	Sigma
- Incubadores de CO ₂	
- Campanas de flujo laminar	
- Microscopio óptico invertido	

- Hormonas y vitaminas

- Calcitriol ó vitamina D ₃ (1,25(OH) ₂ D ₃)	Roche
- Vitamina K ₁ (Fitomenadiona)	Roche
- Ácido ascórbico (Vitamina C)	Sigma

- Material para cuantificar proteínas secretadas y proteínas totales

- Enzimoimmunoensayo (ELISA) del péptido C-terminal del procolágeno tipo I (PICP)	Metra Biosystems
- Ensayo inmunoradiométrico (IRMA) de osteocalcina	Nichols
- IRMA del péptido N-terminal del procolágeno tipo III (PIINP)	Orion, Diagnostica

- ELISA de IL-6 humana Medgenix
- ELISA de GM-CSF humano Immunotech
- ELISA de IL-6 murina Assay Designs
- ELISA de TNF- α murino R&D Systems
- Contador de radiactividad γ
- Lector de placas ELISA Sorin Biomedica
- Cuantificación de la proteína total (Reactivo de Bradford) Bio-Rad

- Material para medir la proliferación celular

- Cámara de Neubauer
- Azul de tripan

- Material para la extracción de ARN, transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y electroforesis en geles de agarosa

- Reactivo Trizol (Extracción de ARN) Gibco
- Dietilpirocarbonato (DEPC), inhibidor de RNAasas Sigma
- dNTP, MgSO₄, tampón de las enzimas AMV (RT) y Tfl (PCR) Promega
- Cebadores específicos de osteocalcina e IL-6 Gibco
- Termociclador Perkin-Elmer
- Agarosa Sigma, Bio-Rad
- Cubetas de electroforesis de ácidos nucleicos Bio-Rad, Laboplast
- Bromuro de etidio, agente intercalante Sigma
- Densitómetro de barrido 1D Manager

- Material para la purificación y secuenciación del ADN

- Gene Clean

Bio 101

- Secuenciación

Perkin Elmer

3. CÉLULAS PARA LA REALIZACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE OB HUMANOS Y EL COCULTIVO (OB HUMANOS-MACRÓFAGOS DE RATÓN)

Los tipos celulares utilizados fueron OB y macrófagos. Los OB fueron cultivados individualmente para alcanzar los objetivos del 1al 5 y también fueron cocultivados con macrófagos para desarrollar el último objetivo del presente estudio.

3.1. Células osteoblásticas humanas

Se realizaron cultivos primarios de OB humanos procedentes de explantes quirúrgicos de pacientes sometidos a artroplastias de rodilla (**Fig. 5**). Estas células se caracterizan por expresar y secretar de modo regulado, dependiendo del estadio de diferenciación, varios marcadores característicos del fenotipo osteoblástico, como son la secreción de colágeno tipo I, de fosfatasa alcalina y secreción de osteocalcina en respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. También producen AMP cíclico en respuesta a PTH [173,174].

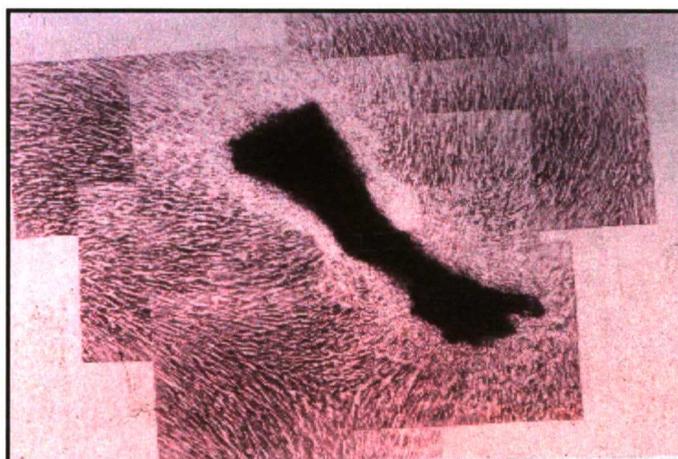


Fig. 5. Composición fotográfica de OB humanos en cultivo primario saliendo del explante óseo.

3.2. Células J774

Los macrófagos de ratón utilizados pertenecen a la línea J774 (ATCC, American Type Culture Collection) (Rockville, MD, U.S.A). Ésta es una línea celular inmortalizada y bien diferenciada que es capaz de llevar a cabo la fagocitosis. Sus características morfológicas y su respuesta a las partículas de desgaste es similar a la de los macrófagos encontrados en la interfaz hueso-implante [146].

B) MÉTODOS

1. ANÁLISIS MICROESTRUCTURAL

La caracterización microestructural se hizo mediante difracción de Rayos X (DRX) utilizando un difractómetro Phillips X'Pert MPD con radiación $K\alpha$ del Cu ($\lambda = 1,5418$ Å). Las muestras se estudiaron empleando una geometría cofocalizada tipo Bragg-Brentano, en la que es posible el movimiento muestra y detector; la muestra se desplaza un ángulo θ , mientras el detector lo hace un ángulo 2θ . Se realizó un barrido $2\theta = 80^\circ$ con un paso de ángulo de 0.04° y un tiempo de conteo de 1 segundo por paso.

2. ANÁLISIS QUÍMICO

Las muestras de alúmina de distinta procedencia vienen acompañadas de su composición química desde los laboratorios de origen. Para confirmar la composición y grado de pureza de las alúminas, se procedió a la caracterización cuantitativa. El análisis cuantitativo se ha llevado a cabo por vía húmeda, tanto por técnicas instrumentales (Espectrofotometría de Absorción Atómica, Espectrofotometría de Absorción Molecular UV-Vis y Espectrometría de Emisión por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES), como por métodos clásicos de análisis (Volumetrías y Gravimetrías).

Paralelamente, se realizó un estudio comparativo (análisis semicuantitativo), por Espectrometría de Emisión por Fluorescencia de Rayos-X por dispersión de longitudes de onda (Ánodo de Rh), de las mismas muestras. La preparación de los polvos de

alúmina, para su posterior análisis, se realizó por compactación directa de los mismos en forma de “pastillas compactadas”.

3. ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO Y MORFOLÓGICO

Para llevar a cabo la caracterización granulométrica de todos los materiales en estudio se han utilizado: a) un microscopio óptico, b) un equipo de análisis de imagen y en los casos que fue necesario c) un microscopio electrónico de barrido (SEM).

La caracterización morfológica se hizo para todas las muestras con el SEM.

3.1. Microscopía óptica

Se utilizó un microscopio Nikon Measuroscope MM-11 que está dotado de una mesa XY con un campo de medida de 80 mm x 40 mm y con una sensibilidad de lectura de 1 μ m. Se contaron un número suficientemente elevado de partículas y fue determinado el diámetro de las mismas para el posterior análisis estadístico.

3.2. Equipo de análisis de imagen

El equipo para realizar el análisis granulométrico fue un equipo Optimas dotado del programa de análisis de imagen Sigma Scan Pro. Para determinar el tamaño de las partículas se fotografiaron varios campos de cada material, bien con el microscopio óptico o con el electrónico, conteniendo un número de partículas representativo de la muestra. Las fotografías se ampliaron, las partículas se calcaron sobre hojas de transparencia y mediante el programa Sigma Scan Pro, se determinó la longitud del eje máximo, que elige los dos puntos más alejados de una partícula definidos como $(LemX_1, LemY_1)$ y $(LemX_2, LemY_2)$. Así, la longitud del eje máximo viene dada por la fórmula siguiente:

$$\text{Longitud del eje máximo} = (\text{Maj}X_2 - \text{Maj}X_1)^2 + (\text{Maj}Y_2 - \text{Maj}Y_1)^2$$

3.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La técnica de microscopía electrónica de barrido consiste en hacer incidir un haz de electrones procedente de un filamento. Dicho haz es acelerado y posteriormente focalizado mediante una serie de lentes electromagnéticas sobre la muestra sometida a estudio. Debido a la interacción que sufren los electrones con la muestra se generan una serie de señales electromagnéticas que, convenientemente recogidas y amplificadas, permiten obtener información del área desde un punto de vista microscópico. En este estudio se utilizó un microscopio JEOL JXA 840 Scanning Microanalyser y se aplicó un voltaje de aceleración de 10 a 15 KV, dependiendo de las condiciones de la muestra. De los materiales sometidos a estudio, sólo las partículas de material metálico de la aleación MA 956 son conductoras. El resto son aislantes, por lo que para poder ser observadas en el SEM tuvieron que ser recubiertas con una fina capa de oro.

4. OBTENCIÓN DE LOS EXPLANTES ÓSEOS Y CULTIVOS PRIMARIOS DE OB HUMANOS

Se realizaron seis series de cultivos primarios de células osteoblásticas humanas procedentes de explantes óseos. Todos los explantes procedían de hueso trabecular de rodilla de pacientes osteoarthríticos sometidos a un implante protésico en el Departamento de Traumatología del Hospital La Paz (Madrid).

Algunas de las muestras óseas fueron analizadas histológicamente en el Servicio de Anatomía Patológica, no encontrándose células mononucleares, lo que indica la ausencia de focos inflamatorios locales o cercanos. Además ninguno de los pacientes tenía síntomas clínicos ni bioquímicos de alteraciones metabólicas óseas.

La obtención de los cultivos primarios se realizó según Martínez y col. [174] (**Anexo Fig. 6**). El hueso trabecular de los explantes óseos obtenidos, cada uno de ellos de un donante distinto, fue troceado en fragmentos de 1 mm² y lavado con una solución tampón de fosfato (PBS), para eliminar los restos de células de la médula ósea adheridas. Estos fragmentos fueron colocados en frascos de cultivo, con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), que contenía 4,5 g/L de glucosa, 15% de SBF (suero bovino fetal), 100 UI/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina, a 37°C

en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Este medio se cambió dos veces por semana y la confluencia se alcanzó de cuatro a seis semanas después de la siembra (**Anexo Fig. 6, FASE 1**).

Los cultivos primarios obtenidos fueron divididos en las seis series indicadas, cada una de ellas destinada a la realización de un objetivo en concreto.

1ª SERIE .- Destinada a determinar el efecto de las partículas de polietileno respecto a las de alúmina sobre el crecimiento celular osteoblástico. Se evaluaron dos tamaños diferentes de partículas, < 80 µm y < 160 µm. Las muestras se obtuvieron de 18 pacientes de edades (70±6 años) divididos en dos grupos:

- Con 12 muestras se realizaron 12 cultivos primarios del grupo < 160 µm (grupo 1).
- Con las 6 restantes se realizaron los cultivos primarios del grupo < 80 µm (grupo 2).

2ª SERIE .- Se evaluó el efecto del tamaño de las partículas de polietileno, < 30 µm y < 160 µm, sobre varias funciones del fenotipo celular osteoblástico como son: secreción de PICP, fosfatasa alcalina y osteocalcina. Las muestras procedían de 10 pacientes de edades (68±7 años).

3ª SERIE .- Se determinó el efecto del tamaño de las partículas de MA 956, < 10 µm y < 80 µm, sobre los mismos parámetros que en la 2ª SERIE. Las muestras procedían de 11 pacientes de edad (71±6 años).

4ª SERIE .- Se determinó el efecto del tamaño de las partículas de alúmina, < 10 µm y < 80 µm, sobre los mismos parámetros que en las dos series precedentes. Las muestras se obtuvieron de 7 pacientes de edad (71±6 años).

5ª SERIE .- Se evaluó el efecto del polietileno < 30 µm sobre la expresión del ARNm del gen de la osteocalcina. Las muestras procedían de 7 pacientes de edad (65±5 años).

6ª SERIE .- Se comparó el efecto de las partículas de polietileno y de alúmina de tamaño < 5 µm sobre la expresión y la secreción de la IL-6. Las muestras utilizadas provenían de 15 pacientes de edad (67±6 años); en 9 de los cultivos primarios se evaluó el efecto de las partículas de polietileno. En los 6 restantes se evaluó el efecto de las partículas de alúmina. Estos últimos 6 cultivos también se utilizaron para realizar el cocultivo con los macrófagos.

Las células alcanzaron confluencia en los frascos de 75 cm² de 4 a 6 semanas después de la siembra y fueron subcultivadas en frascos de 25 cm², a excepción de los cultivos de la última serie en los que las células se pasaron a frascos de 75 cm². En cada frasco de 25 cm² se introdujeron las partículas del biomaterial correspondiente a la serie a realizar a una concentración de 0.2 mg/mL [175]. Otros frascos se mantuvieron como control sin adición de biomaterial (**Anexo Fig. 6, FASE 2**).

Los cultivos en crecimiento en los frascos de 25 cm² alcanzaron la confluencia transcurridas dos semanas aproximadamente. Durante este tiempo el medio fue cambiado dos veces por semana y fueron añadidas partículas de los materiales correspondientes en cada caso para mantener la concentración deseada, 0.2 mg/mL [175]. Una vez se logró el estado de confluencia, tanto en los frascos de 25 cm² como en los de 75 cm² (última serie), se siguieron tres protocolos distintos que se exponen seguidamente.

4.1. Determinación de la proliferación osteoblástica: protocolo I

Las células confluentes en los frascos de 25 cm², con el biomaterial correspondiente, se tripsinizaron y se sembraron en placas de 24 pocillos (p-24) a una densidad de 2×10^4 células por pocillo, donde fue añadido de nuevo el biomaterial correspondiente a cada ensayo en la misma concentración (0.2 mg/mL). También se sembraron pocillos sin biomaterial como control. El medio se cambió dos veces por semana y fueron añadidas nuevas partículas de biomaterial para mantener constante la concentración deseada (**Anexo Fig. 6, FASE 3 a**). Las células se tripsinizaron y se contaron en cámara de Neubauer [176].

El conteo se realizó a los 3, 6, 9 y 13 días después de la siembra en los cultivos pertenecientes a la 1ª SERIE. Cada día se procedió al conteo de dos pocillos control (sin biomaterial), y otros cuatro pocillos con cada biomaterial, polietileno o alúmina, dos de ellos tratados con cada tamaño de partícula, $< 80 \mu\text{m}$ y $< 160 \mu\text{m}$.

Los resultados obtenidos a los diferentes días de conteo se integraron mediante un programa de análisis cinético (SIPHAR) que utiliza un método trapezoidal [176]. Así se determinó el área bajo la curva (ABC) determinada por los días en cultivo.

4.2. Secreción del péptido C-terminal del procolágeno tipo I (PICP), fosfatasa alcalina, osteocalcina e interleuquina 6 (IL-6): Protocolo II

Para la evaluación de la secreción de las diferentes proteínas relacionadas con el fenotipo osteoblástico, las células se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en placas de 12 pocillos (p-12) y fue añadido el biomaterial correspondiente a la misma concentración (0.2 mg/mL), manteniendo algunos pocillos como control, sin adición de biomaterial. El medio fue cambiado dos veces por semana añadiéndose partículas del biomaterial sometido a estudio en cada caso. La confluencia se alcanzó transcurridas dos semanas después de la siembra.

Para la 2ª SERIE a unos pocillos se le añadieron partículas de polietileno $< 30 \mu\text{m}$, a otros $< 160 \mu\text{m}$, y los restantes se mantuvieron como control. Para la 3ª y la 4ª SERIE se añadieron partículas de MA 956 y alúmina, respectivamente. Así para la serie del MA 956 había pocillos con MA 956 $< 10 \mu\text{m}$, otros con MA 956 $< 80 \mu\text{m}$, y otros eran control. Idénticamente en la serie de la alúmina, algunos pocillos contenían alúmina $< 10 \mu\text{m}$, otros $< 80 \mu\text{m}$ y otros fueron control (**Anexo Fig. 6, FASE 3 b**).

La determinación de la expresión y secreción de la IL-6 se realizó en los cultivos de la 6ª SERIE, los cuales, una vez alcanzaron la confluencia en los frascos de 75 cm^2 fueron subcultivados en placas de 6 pocillos (p-6) a una concentración de 3×10^5 células/pocillo y, en este caso, alcanzaron la confluencia en ausencia de biomaterial (**Anexo Fig. 6, FASE 3 c**).

4.2.1. Obtención del medio celular condicionado en el cultivo primario

Después de dos semanas en cultivo las células alcanzaron confluencia en la placa p-12, tras lo cual, fueron lavadas con PBS e incubadas en un medio DMEM libre de suero, con 1 g/L glucosa, suplementado con 10 nM de vitamina K, 50 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico y 1 g/L de albúmina bovina sérica (BSA). Las células permanecieron en este medio 72 horas, en presencia (cultivo estimulado) o ausencia (cultivo basal) de 10 nM de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Al principio del período de incubación con este medio se añadieron más partículas del biomaterial correspondiente a cada ensayo a la dosis de 0.2 mg/mL.

Las células que crecían en las placas p-6 alcanzaron confluencia entre 6 y 8 días, debido a que fueron sembradas a una densidad más elevada. Tras ello, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con 2 ml de medio DMEM suplementado tal y como se especificó anteriormente, en ausencia de vitamina K. Seguidamente, se añadieron las partículas de los biomateriales a ensayar, polietileno o alúmina. En tres cultivos se realizaron curvas de dosis, desde 1 mg hasta 100 mg/pocillo, tanto en los cultivos tratados con polietileno como con alúmina. Para evaluar el efecto del polietileno, a tres pocillos se les añadió polietileno a la dosis de 10 mg/pocillo, otros tres recibieron 50 mg/pocillo y otros tres se mantuvieron en ausencia de biomaterial (Control). El mismo proceso se llevó a cabo en los cultivos tratados con alúmina.

Transcurrido el período de incubación, 72 horas en las placas p-12 y 24 horas en las placas p-6, se recogió el medio celular condicionado, se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas, se separó en alícuotas y se congeló a -80°C . Las células fueron lavadas con PBS y fueron también congeladas a -80°C para la determinación de la proteína total en el caso de las placas p-12 o para la extracción del ARN total para las placas p-6.

El medio celular condicionado de dos o tres pocillos de las placas p-12 con o sin adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y tratados o no con los diferentes biomateriales, polietileno, MA 956 o alúmina, fueron ensayados para los distintos marcadores estudiados en todos los cultivos y los valores medios se calcularon para cada medio condicionado. De modo similar, el medio condicionado de dos o tres pocillos de las placas p-6 tratados con polietileno o con alúmina se ensayaron para la secreción de IL-6, calculándose también los valores medios para cada medio condicionado.

Se recoge en la **Tabla 1** un resumen de los medios condicionados recogidos, clasificados por composición del material, tamaño de la partícula y adición o no de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Tamaño	Polietileno	MA 956	Alúmina
< 5 μm	Basal		Basal
< 10 μm		Basal/Estimulado	Basal/Estimulado
< 30 μm	Basal/Estimulado		
< 80 μm		Basal/Estimulado	Basal/Estimulado
< 160 μm	Basal/Estimulado		

Tabla 1. Clasificación de los medios celulares condicionados.

4.2.2. Determinación de proteínas totales

La determinación de la proteína total de las placas p-12 se realizó mediante tratamiento de las células con NaOH 0,1 N a 65°C y cuantificación por el método de Bradford [177].

4.2.3. Ensayo para la determinación del PICP.

La determinación del PICP, se considera un índice de la formación de matriz ósea *in vitro* [178]. En nuestro estudio fue determinado por duplicado utilizando un inmunoensayo enzimático en microplaca (ELISA) [179]. El ensayo utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PICP y un segundo anticuerpo policlonal de conejo anti-PICP, que se encuentra conjugado a la fosfatasa alcalina. Finalmente se utiliza p-nitrofenilfosfato como sustrato de la fosfatasa alcalina y el producto de la reacción, el p-nitrofenol se mide en un espectrofotómetro.

También se determinaron los niveles de PIIINP, marcador fibroblástico y de células osteoblásticas poco diferenciadas, en el medio celular condicionado mediante un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) [180].

Ambos valores fueron calculados de acuerdo con la concentración de proteína.

4.2.4. Ensayo para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina

La actividad de la fosfatasa alcalina se analizó en el medio condicionado mediante una reacción enzimática colorimétrica durante 30 min a 37°C que utiliza p-nitrofenilfosfato como sustrato en un tampón de dietanolamina 1 M, MgCl₂ 0,5 mM,

pH 9,8 [181]. La actividad enzimática se expresó en nmoles de p-nitrofenol, liberado por min y por mg de proteína.

La fosfatasa alcalina se caracteriza por ser uno de los principales marcadores del fenotipo osteoblástico. Así, para caracterizar el cultivo primario de OB humanos, se realizó una citoquímica, en la que las células en subconfluencia, fueron sembradas en cámaras (Nalge Nunc, Naperville, IL) y tratadas con 40 pmol/l de TGF- β_1 recombinante humano y 10 nmol/l de 1,25(OH) $_2$ D $_3$, dos agentes diferenciadores de los OB en medio libre de suero durante 72 horas [182]. Posteriormente las células fueron incubadas con naftol AS-BI seguido por un rápido tratamiento con una sal de diazonio rojo violeta LB (Sigma, St. Louis, MO), procediéndose al conteo de las células teñidas.

4.2.5. Ensayo para la determinación de la osteocalcina.

La osteocalcina se midió por duplicado en el medio celular condicionado por un IRMA, mediante el uso de anticuerpos específicos contra osteocalcina humana.

La osteocalcina es un péptido de 49 aminoácidos y constituye la principal proteína no colágena del hueso. Este ensayo utiliza dos anticuerpos policlonales diferentes frente a la osteocalcina humana. Uno de los anticuerpos reconoce la región 20-36 del péptido, mientras que el otro, marcado radiactivamente con I 125 , reconoce la región comprendida entre el aminoácido 1 al 19. La radiactividad es directamente proporcional a la cantidad de osteocalcina en la muestra, que fue determinada de acuerdo con la concentración de proteína.

4.2.6. Ensayo para la determinación de la IL-6 humana

La determinación de la secreción de la IL-6 humana se realizó en los medios celulares condicionados por duplicado mediante un ELISA tipo sandwich en microplaca. El ensayo está basado en un sistema que utiliza una combinación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintos epítomos de la IL-6. La utilización de distintos anticuerpos monoclonales permite una elevada especificidad y que el ensayo sea altamente sensible. La IL-6 reacciona con los anticuerpos monoclonales y

con un segundo anticuerpo unido a la enzima peroxidasa, la cual reacciona con el sustrato para dar el producto de la reacción que es determinado colorimétricamente.

4.3. Determinación de la expresión de osteocalcina e IL-6 mediante RT-PCR (transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa): Protocolo III

Las células de la 5ª SERIE, destinada a determinar la expresión de osteocalcina en presencia de partículas de polietileno, alcanzaron la confluencia en los frascos de 25 cm² dos semanas después de la siembra. Dos de los frascos contenían partículas de polietileno < 30 µm, mientras que otros dos se mantuvieron sin adición de biomaterial como control. Después, las células fueron lavadas con PBS y cultivadas durante 72 horas en medio DMEM suplementado como se especifica en el protocolo II en presencia (cultivo estimulado) o ausencia (cultivo basal) de 10 nM 1,25(OH)₂D₃ y fueron añadidas nuevas partículas a la misma concentración, 0.2 mg/mL. Transcurrido el período de incubación el sobrenadante fue descartado y las células fueron congeladas a -80 °C para la extracción del ARN total y posterior determinación de la expresión de osteocalcina.

Por otro lado, las células de la 6ª SERIE, que habían sido congeladas a -80°C tras la retirada del medio celular condicionado para la determinación de la secreción de la IL-6, fueron utilizadas para la extracción del ARN total y la posterior determinación de la expresión de la IL-6.

4.3.1. Determinación por RT-PCR de la expresión de osteocalcina y de IL-6

Los OB congelados a -80°C fueron utilizados para la extracción del ARN total utilizando Trizol.

Se extrajeron aproximadamente 12 µg de ARN total de cada frasco de cultivo de 25 cm² con las células a confluencia y aproximadamente 6 µg de las placas p-6.

Los niveles de ARNm de la osteocalcina y de la IL-6 fueron determinados mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa, utilizando condiciones que proporcionan una amplificación de cantidades de ADN submáximas.

Se utilizaron 0.1 o 1 ng para la osteocalcina y 50 ng para la IL-6 de ARN total, que fueron añadidos a una mezcla de reacción que contenía: 1 mM MgSO₄, 0.2 mM de deoxinucleótidos (dNTP), 1 unidad de Myeloblastosis Virus Aviar, enzima que realiza la transcripción reversa desde ARN a ADN, 1 unidad de la ADN polimerasa termoestable de *Thermus Flavus*, 1 μM de cebadores específicos para el gen de la osteocalcina humana 5'-CATGAGAGCCCTCACACTCC- 3' (sentido); 5'-CAGCAGAGCGACACCCTAGACC- 3' (antisentido), que corresponde a los nucleótidos 18-37 y 315-336 respectivamente, en el gen de la osteocalcina humana (número de acceso en el Gene Bank: X51699) y 0.5 μM de cebadores específicos para el gen de la IL-6 humana 5'-TTCGGTCCAGTTGCCTTCT- 3' (sentido); 5' -GTACTCATCTGGACAGCTC- 3' (antisentido), que corresponden a los nucleótidos 88-106 y 485-503 respectivamente, en el gen de la IL-6 humana (numero de acceso en el Gene Bank Y00081).

El producto obtenido con la utilización de estos primers o cebadores es de 319 pares de bases para la osteocalcina y de 416 pb para la IL-6.

Además también se coamplificó el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con cebadores específicos para el gen humano: 5'-TCCTGCACCACCAACTGCTTA- 3' (sentido) y 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCC- 3', que amplifican un fragmento de 524 pb correspondientes a los nucleótidos 445-968 del ADN copia (ADNc) (número de acceso en el Gene Bank JO2642). Este gen se utilizó como control constitutivo.

El ARN total y los cebadores fueron incubados durante 2 minutos a 94°C para desnaturalizar las estructuras secundarias. La mezcla de reacción (10 μl), con los cebadores y el ARN fueron incubados durante 45 min a 48°C teniendo lugar la transcripción inversa. A continuación se llevó a cabo la PCR utilizando los siguientes ciclos: 2 minutos a 94°C (desnaturalización), seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturalización), 1 min 60°C (reasociación), y 2 minutos a 68°C (extensión); por último, se realizó una extensión final de 7 minutos a 68°C (**Fig. 7**).

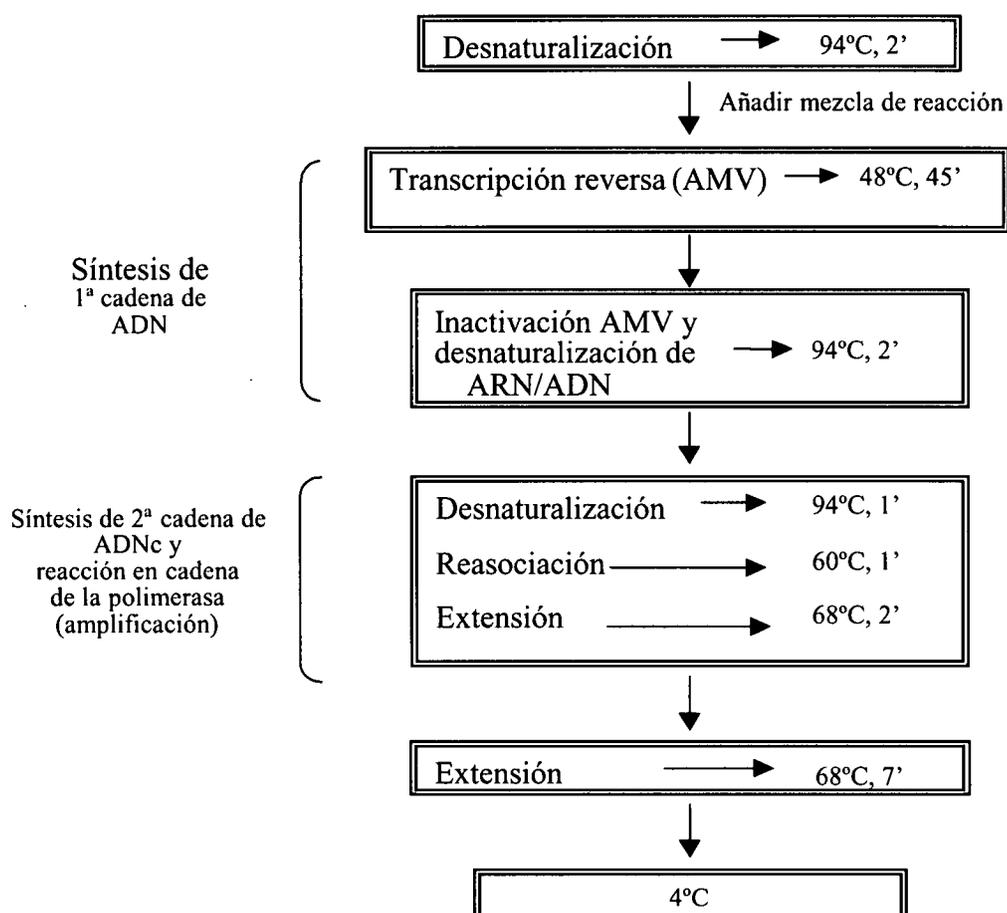


Fig. 7. Pasos seguidos en la realización de la RT-PCR para la determinación de la expresión de la osteocalcina y de la IL-6.

Los productos obtenidos por la RT-PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% y las bandas de osteocalcina, IL-6 y GAPDH visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio (50 µg/mL). Posteriormente, fueron fotografiadas y cuantificadas por densitometría de barrido. Los valores obtenidos para la osteocalcina, así como los obtenidos para la IL-6 fueron normalizados frente a sus correspondientes de GAPDH, utilizados como control constitutivo.

4.3.2. Purificación y secuenciación del producto de la PCR

Se purificó la banda de ADNc obtenida por la RT-PCR para la osteocalcina y la IL-6 mediante un sistema específico. Posteriormente con este ADNc purificado se

realizó una PCR para amplificarlo (25 ciclos a 58°C) y se separó la banda en un gel de agarosa volviéndose a purificar de nuevo el ADNc con el sistema anteriormente mencionado.

Con una determinada cantidad de este ADNc purificado se procedió a determinar la secuencia de la osteocalcina y de la IL-6 mediante reactivos comerciales, utilizando la Taq FS DNA polimerasa. Las secuencias se resolvieron en un secuenciador automático ABI PRISM 377.

5. COCULTIVOS MACRÓFAGOS DE RATÓN-OB HUMANOS

Las células que componían el cocultivo fueron OB humanos en cultivo primario y macrófagos de ratón de la línea J774. El sistema de cocultivo utiliza un inserto en el que ambos tipos celulares están separados físicamente. La membrana porosa del filtro permite que los mediadores liberados por ambos tipos celulares interactúen entre sí (Fig. 8).

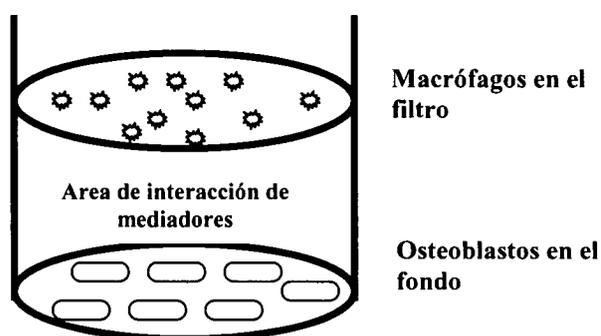


Fig. 8. Representación del sistema de cocultivo.

Los macrófagos crecieron en frascos de 25 cm² con medio de cultivo DMEM conteniendo 10 % de SBF, 100 UI/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomicina. Fueron incubadas a 37 °C con 5 % de CO₂ y el medio fue cambiado dos veces por semana.

Los OB humanos utilizados corresponden a la 6ª SERIE y fueron cultivados tal y como se indica en el apartado 4.

5.1. Cocultivo celular y preparación del medio condicionado

Las células osteoblásticas en monocapa en los cinco frascos de 75 cm² fueron tripsinizadas y sembradas en tres placas de seis pocillos (p-6) a una densidad de 3x10⁵ células/pocillo. Alcanzaron la confluencia tras seis u ocho días después de la siembra cambiándose el medio cada dos días.

En este momento se procedió a la siembra de los macrófagos en los insertos a una densidad de 10⁶ células/inserto. Transcurridas 24 horas, los macrófagos se lavaron con PBS con el fin de retirar las células no adheridas y los mediadores liberados en el proceso de adhesión. Seis insertos se mantuvieron con macrófagos aislados sin contacto con OB, añadiéndose 2 ml de medio DMEM libre de suero, con 1 g/L glucosa, suplementado con 50 µg/mL de ácido ascórbico, 1 g/L BSA. A tres de estos pocillos se les añadieron partículas de alúmina, mientras que otros tres se mantuvieron sin partículas. Otros seis insertos se colocaron sobre los pocillos en los que crecían los OB que previamente habían sido lavados con PBS. Tanto a los insertos con los macrófagos como a los pocillos con los OB se les añadió 1 ml de medio DMEM libre de suero, que en tres de los casos contenían partículas. Otros seis pocillos se mantuvieron con OB aislados. A tres de éstos se les añadieron 2 ml de medio con partículas de alúmina y otros tres permanecieron sin ellas. Las células fueron incubadas durante 24 horas, tras lo cual, el medio condicionado fue recogido, filtrado a través de filtros de 0.22 µm y congelado a -80°C para la cuantificación de las citoquinas secretadas. Por otra parte, las células osteoblásticas fueron congeladas a -80°C para la posterior extracción del ARNm.

Se recogieron los siguientes medios condicionados procedentes de:

- 1) Macrófagos aislados (mac).
- 2) Macrófagos en presencia de alúmina (mac+al).
- 3) OB aislados (ob).
- 4) OB en presencia de alúmina (ob+al).
- 5) OB y macrófagos (ob+mac).
- 6) OB y macrófagos en presencia de alúmina (ob+mac+al).

Con este protocolo se realizaron tres ensayos de curvas de dosis respuesta con una concentración de partículas de alúmina entre 1 y 100 mg/pocillo. Una vez determinada

la dosis de máxima estimulación se realizaron seis experimentos en una serie de seis cultivos diferentes tratados con dicha dosis.

5.1.1. Tratamiento de las células osteoblásticas con factor de necrosis tumoral α (TNF- α) murino exógeno

Se utilizaron tres cultivos primarios de OB humanos para determinar el efecto del TNF- α sobre la secreción de IL-6. Se siguió el protocolo anteriormente descrito. Tres pocillos se mantuvieron como control y otros tres se incubaron durante 24 horas en medio libre de suero con 300 pg/mL de TNF- α (Endogen, Woburn, MA, USA). Posteriormente, el medio celular condicionado fue recogido y congelado a -80°C .

5.2. Secreción de citoquinas implicadas en resorción ósea en el cocultivo

En los medios condicionados de dos o tres pocillos de cada tipo se determinó la secreción de TNF- α murino, IL-6 murina y humana y GM-CSF humano. En la **Tabla 2** se especifica cuales citoquinas fueron determinadas en los distintos medios condicionados.

ESPECIE	CITOQUINAS		
	TNF- α	IL-6	GM-CSF
Ratón	mac, mac+al, ob+mac, ob+mac+al	mac, mac+al, ob+mac, ob+mac+al	
Humano		ob, ob+al, ob+mac, ob+mac+al	ob, ob+al, ob+mac, ob+mac+al

Tabla 2. Clasificación de las citoquinas determinadas en los distintos medios condicionados.

5.2.1. Ensayo para la determinación del TNF- α murino

Los niveles del TNF- α de ratón se cuantificaron por duplicado en los medios celulares condicionados utilizando un ELISA, que utiliza un anticuerpo policlonal específico para TNF- α de ratón y un anticuerpo policlonal unido a la peroxidasa.

5.2.2. Ensayos para la determinación de la IL-6 murina y humana

La IL-6 murina fue determinada por duplicado en los medios celulares condicionados utilizando un ELISA que utiliza dos anticuerpos dirigidos contra la IL-6 de ratón, uno de los cuales está biotinilado y que forman la unión tipo sandwich al cual se une la enzima conjugada estreptavidina-peroxidasa.

La determinación de la secreción de la IL-6 humana se realizó tal como se especifica en el apartado 4.2.6.

5.2.3. Ensayo para la determinación del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) humano

La determinación de los niveles de GM-CSF en los medios celulares condicionados se realizó por duplicado mediante un ELISA que utiliza un anticuerpo monoclonal unido a la microplaca y un segundo anticuerpo monoclonal que está biotinilado. Al sandwich formado se une el conjugado estreptavidina-peroxidasa.

Por otro lado, se procedió a la extracción con Trizol del ARN total de las células osteoblásticas congeladas a -80°C de los siguientes pocillos de las p-6: ob, ob+al, ob+mac y ob+mac+al.

Los niveles del ARNm fueron determinados mediante RT-PCR semicuantitativa. Se utilizaron 0,5-50 ng de ARN total, y se añadieron a una mezcla de reacción que contenía 0.5 μM de cebadores específicos para el gen de la IL-6 humana (ver apartado 4.3.1).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados descritos en el texto se han expresado como media \pm error estándar (ES).

- 1ª SERIE. Las diferencias entre los dos tamaños de partícula de polietileno sobre la proliferación osteoblástica fueron analizadas por el test de Mann-Whitney. Las diferencias entre el grupo control y el polietileno o la alúmina, fueron analizadas por el test de Wilcoxon para muestras pareadas.
- 2ª, 3ª y 4ª SERIE. Las diferencias entre los valores basales y tratados con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y las diferencias entre los valores controles y tratados con los diferentes biomateriales (polietileno, MA 956 o alúmina) en la secreción de las distintas proteínas, fueron analizadas por el test de Wilcoxon para muestras pareadas.
- 5ª SERIE. Las diferencias entre los valores de expresión de osteocalcina basal y tras la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y las diferencias entre los cultivos tratados y no tratados con polietileno fueron analizadas por la t-Student para muestras pareadas.
- 6ª SERIE. Las diferencias entre polietileno y alúmina en la síntesis de IL-6 fueron analizadas por el test de Mann-Whitney. Las diferencias entre el control y tras la adición de partículas, se analizó por el test de Wilcoxon para muestras pareadas. En el cocultivo, las diferencias entre los distintos grupos fueron analizadas por este último test.

Resultados

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y MICROESTRUCTURAL DE LOS MATERIALES ENSAYADOS

La composición y pureza de las alúminas de distintas procedencias se muestra en la tabla siguiente. Los valores están expresados en % en masa.

Tamaño	Al ₂ O ₃	Na ₂ O	SiO ₂	CaO	Fe ₂ O ₃	Otros óxidos
< 5 μm	99,62	0,16	0,025	0,072	0,064	0,059
< 10 μm	99,75	0,12	0,028	0,011	0,033	0,058
< 80 μm (a)	99,4	0,46	0,069	0,037	0,024	0,010
< 80 μm (b)	99	0,627	0,184	0,072	0,064	0,053
< 160 μm	99	0,627	0,184	0,072	0,064	0,053

Tabla 3. Composición química de las distintas alúminas ensayadas. Están expresadas en % en masa.

El diagrama de difracción de Rayos X de la alúmina < 5 μm se corresponde con la fase α-Al₂O₃ (Fig. 9). Los máximos asignados a α-Al₂O₃ (ASTM 42-1468) son muy intensos y definidos, lo que indica que se trata de una alúmina muy cristalina. Asimismo, los máximos de difracción situados a valores altos de ángulo, desde aproximadamente 2θ = 50°, presentan claramente el desdoblamiento kα₁/kα₂.

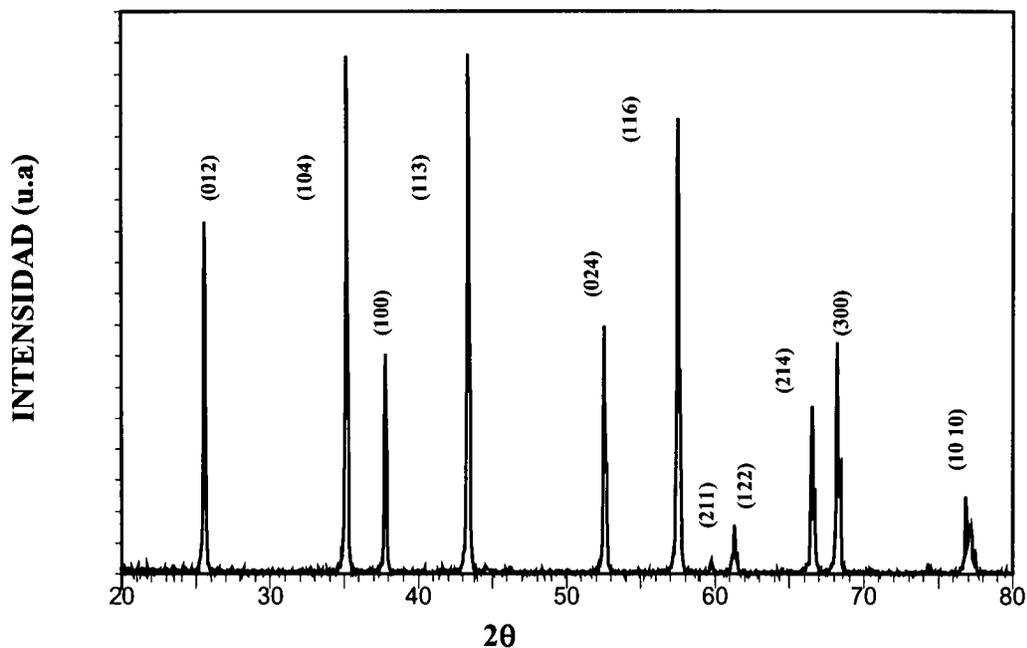


Fig. 9. Diagrama de DRX de la alúmina < 5 μm .

El diagrama de difracción de Rayos X de la alúmina < 10 μm es idéntico al de las partículas de alúmina < 5 μm .

El diagrama de difracción de rayos X de la alúmina < 80 μm (a) permite identificar $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ bien cristalizada. Junto a esta fase aparece un conjunto de máximos de poca intensidad y poco resueltos, que corresponde a una segunda fase minoritaria, que acompaña a la fase mayoritaria $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (**Fig. 10**). Esta segunda fase fue identificada como $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$ (ASTM 35-0121).

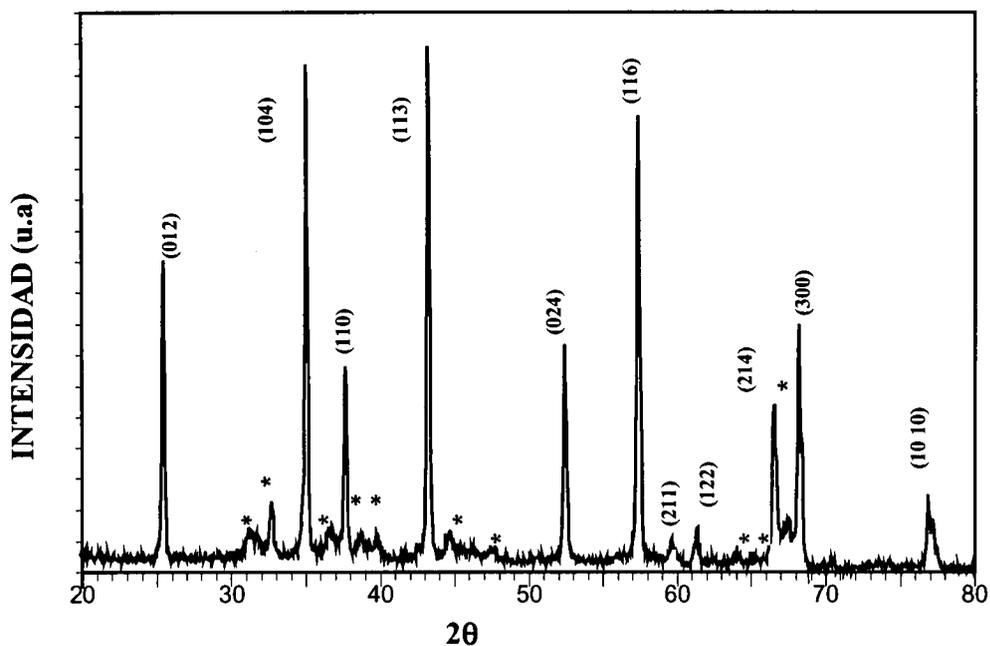


Fig. 10. Diagrama de DRX de la alúmina < 80 μm (a). Las reflexiones marcadas (*) corresponden a la fase minoritaria, $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$ y las reflexiones a las que se han asignado índices corresponden a la fase mayoritaria $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$.

Las alúminas < 80 (b) y < 160 μm presentan un diagrama de difracción idéntico ya que se obtuvieron por tamizado de una alúmina de mayor tamaño de partícula. En el diagrama se observa que la fase mayoritaria, al igual que con las otras tres alúminas, es $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$. Sin embargo, también se pueden apreciar un par de máximos menos intensos que podrían corresponder a una fase minoritaria identificada como β -alúmina (ASTM-10-0414) (Fig. 11).

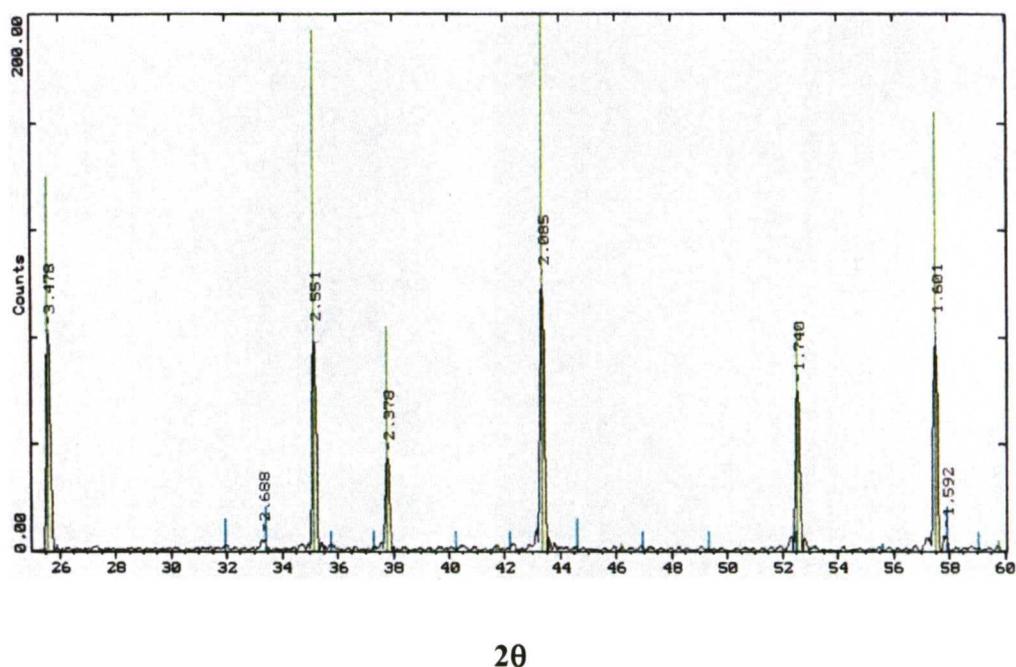


Fig. 11. Diagrama de DRX para la alúmina < 80 μm (b) y < 160 μm . Las reflexiones marcadas en verde claro corresponden a la fase mayoritaria $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$.

Por otra parte, los diagramas de difracción obtenidos para los distintos tipos de polietileno fueron similares, por lo que se representan dos de ellos a modo de ejemplo. Se pone de manifiesto la presencia de dos reflexiones importantes a valores de $2\theta = 21,39^\circ$ y $23,79^\circ$. Se pueden observar pequeñas desviaciones del fondo de pequeña magnitud, sin llegar a formar máximos definidos (Fig. 12).

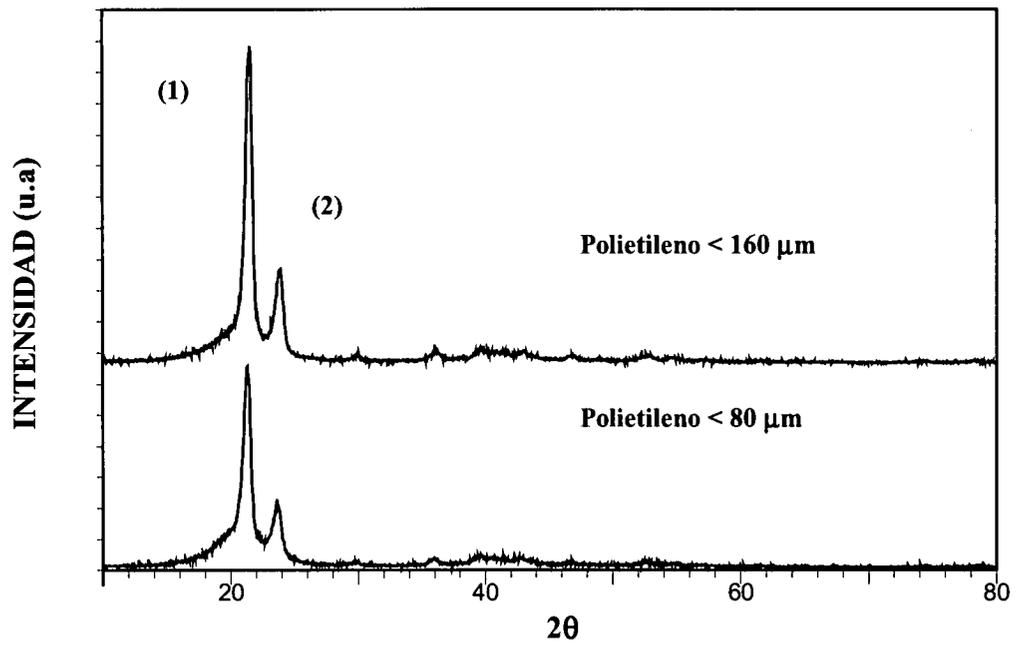


Fig. 12. Diagramas de DRX del polietileno de ambos tamaños, < 80 μm y < 160 μm .

2. CARACTERIZACIÓN GRANULOMÉTRICA Y MORFOLÓGICA DE LOS MATERIALES ENSAYADOS

Las distribuciones estadísticas del tamaño de partícula de las distintas muestras se expresan como % en volumen de partículas. El cuartil 1, la mediana y el cuartil 3 indican el tamaño de partícula en micrómetros por debajo del cual se encuentra respectivamente el 25, 50 y 75 % de la muestra (**Tabla 4**).

MATERIAL	Tamaño	Cuartil 1	Mediana	Cuartil 3
Polietileno	< 5 μm	2	3	4
	< 30 μm	24	29	35
	< 80 μm	58	70	81
	< 160 μm	69	96	160
MA 956	< 10 μm	10	13	18
	< 80 μm	70	82	90
Alúmina	< 5 μm	3	4	6
	< 10 μm	5	10	16
	< 80 μm (a)	70	80	104
	< 80 μm (b)	50	67	78
	< 160 μm	63	86	118

Tabla 4. Distribuciones granulométricas de los materiales sometidos a estudio.

Las características morfológicas de las partículas fueron examinadas mediante microscopía electrónica de barrido.

La **Figura 13** muestra las imágenes de las partículas de polietileno de las distintas granulometrías utilizadas. La **Fig. 13 A** corresponde a las partículas de polietileno < 5 μm . Se puede apreciar en ellas una forma casi esférica, característica de partículas de polietileno de alta densidad (HDPE) [183]. En la imagen mostrada las partículas forman agregados pero antes de ser añadidas a los cultivos fueron sonicadas con el fin de obtener una distribución uniforme. Aunque el polietileno de ultraalto peso molecular

(UHMWPE) es el utilizado para aplicaciones ortopédicas, analizamos la respuesta celular en una parte de nuestro estudio frente al HDPE, ya que las partículas de UHMWPE no están disponibles comercialmente en el rango $< 5 \mu\text{m}$. Las tres imágenes restantes, **Fig. 13 (B, C y D)** corresponden a UHMWPE $< 30 \mu\text{m}$, $< 80 \mu\text{m}$ y $< 160 \mu\text{m}$, respectivamente. Las partículas presentan una forma globular con una superficie rugosa comparable con el tipo predominante de partículas aisladas del tejido periprotésico de prótesis de cadera aflojadas [131-133]. La mayoría de las partículas recogidas *in vivo* son de tamaño mucho más pequeño y se encuentran en el rango submicrométrico. Sin embargo, el rango es amplio ya que también pueden ser localizadas partículas de forma más alargada y de tamaño de hasta $200 \mu\text{m}$. La resorción ósea asociada con la presencia de partículas de polietileno entre 20 y $200 \mu\text{m}$ ha sido reproducida experimentalmente en un modelo animal [169].

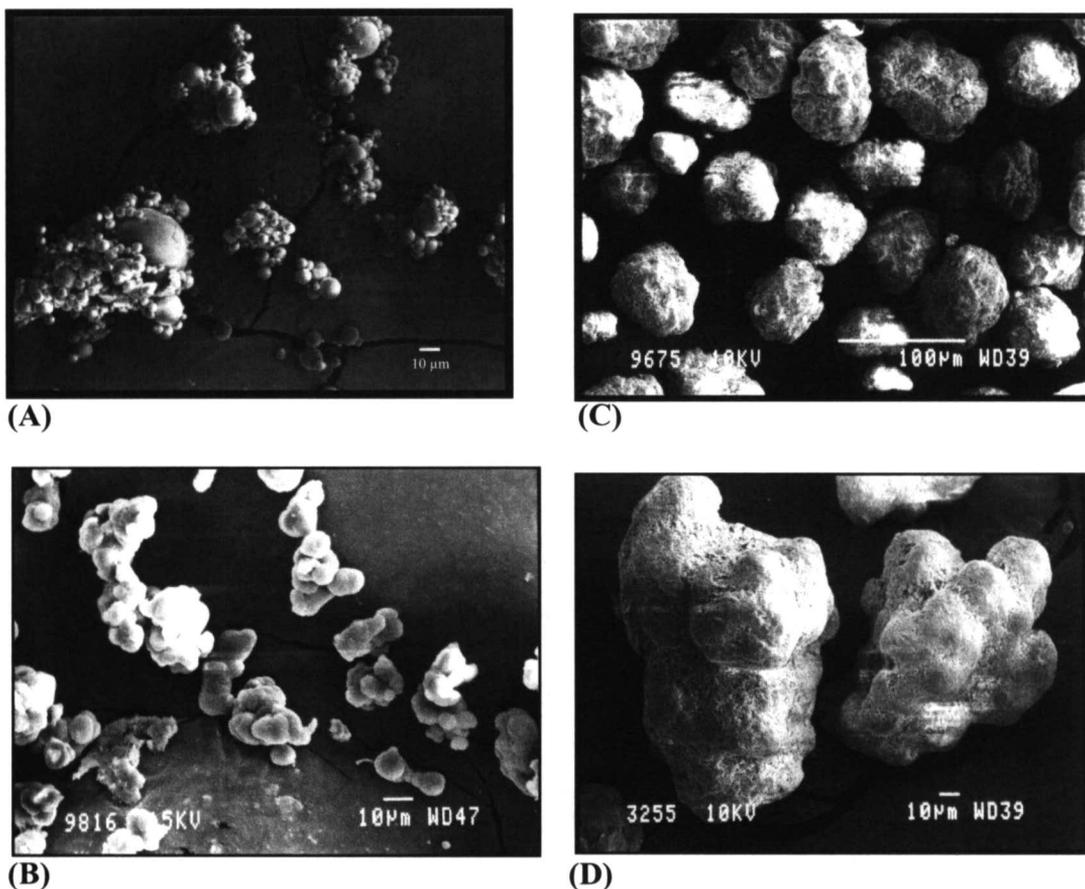


Fig. 13. Imágenes de las partículas de polietileno obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido. (A) $< 5 \mu\text{m}$, (B) $< 30 \mu\text{m}$ (C) $< 80 \mu\text{m}$ y (D) $< 160 \mu\text{m}$.

Las partículas metálicas de la aleación MA 956 en los distintos tamaños utilizados se representan en la **Fig. 14**. Las **Fig. 14 (A y B)**, corresponden a las partículas de MA 956 $< 10 \mu\text{m}$ y $< 80 \mu\text{m}$, respectivamente. Ambas distribuciones de partículas presentan formas irregulares, al igual que otras partículas metálicas que han sido observadas en estudios *in vivo* [132]. En dicho estudio se ha observado que las partículas metálicas tienen un tamaño similar al de las partículas de polietileno, no encontrándose diferencias en el tamaño medio de las partículas metálicas dependiente de la composición del metal.

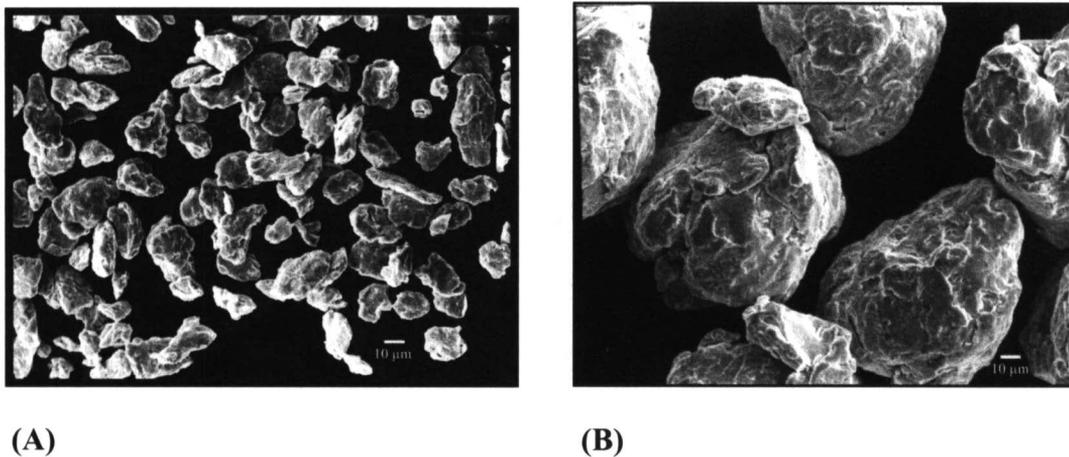
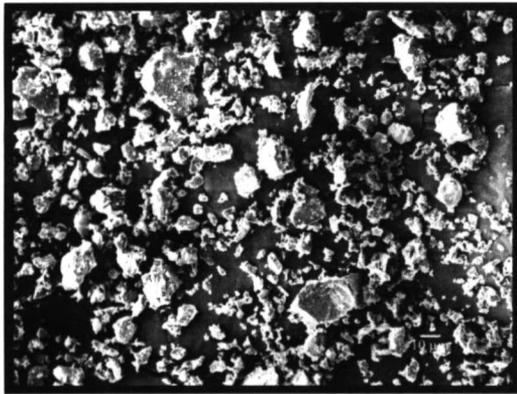


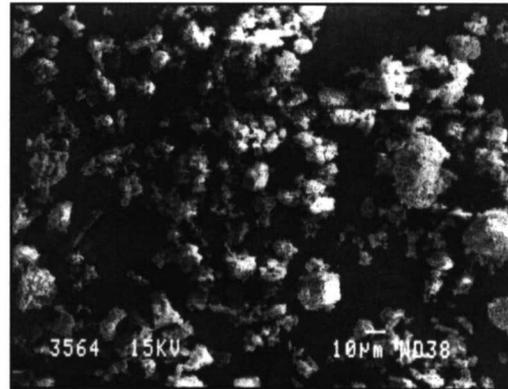
Fig. 14. Imágenes de las partículas de MA 956 obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido. (A) $< 10 \mu\text{m}$ y (B) $< 80 \mu\text{m}$.

Las imágenes de la **Figura 15** muestran las distintas partículas de alúmina ensayadas. Las **Fig. 15 (A y B)** pertenecen a las alúminas más pequeñas utilizadas, $< 5 \mu\text{m}$ y $< 10 \mu\text{m}$ respectivamente. Las **Fig. 15 (C y D)** corresponden a las partículas de alúmina de tamaño $< 80 \mu\text{m}$ y $< 160 \mu\text{m}$ respectivamente.

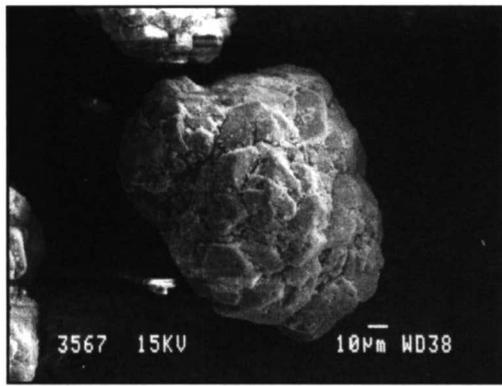
Como se puede apreciar, la morfología de las partículas es bastante irregular, tal y como ha sido observado en las partículas de alúmina recogidas *in vivo* [184].



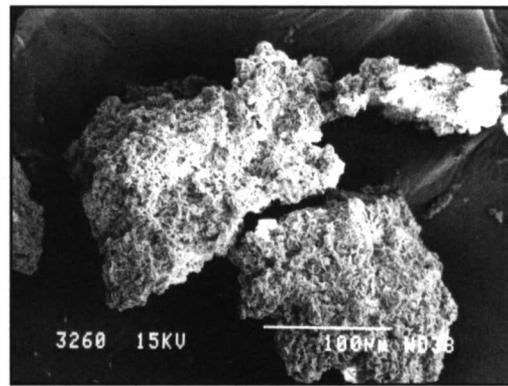
(A)



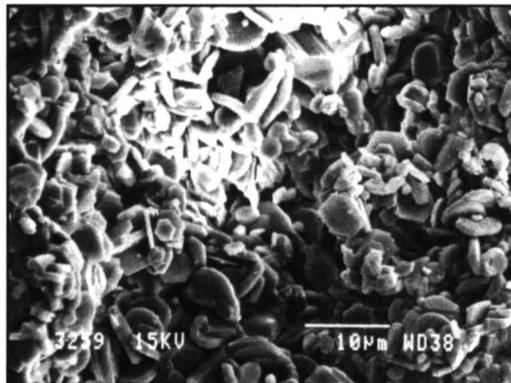
(B)



(C)



(D)



(E)

Fig. 15. Imágenes de las partículas de alúmina obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido. (A) $< 5 \mu\text{m}$, (B) $< 10 \mu\text{m}$, (C) $< 80 \mu\text{m}$, (D) $< 160 \mu\text{m}$ y (E) Detalle a 2000 aumentos de la superficie de una partícula de alúmina $< 160 \mu\text{m}$.

3. CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE OB HUMANOS

El fenotipo osteoblástico se caracteriza por la secreción de fosfatasa alcalina y colágeno tipo I, así como por la secreción de osteocalcina en respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y por la producción de AMPc en respuesta a PTH.

Con objeto de caracterizar nuestros cultivos de OB humanos estudiamos la respuesta de la osteocalcina al $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10 nM), un agente diferenciador de estas células. Se observó que este metabolito indujo en los cultivos un incremento en la secreción de ésta proteína.

Además, se observó que tras la estimulación con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10 nM) y $\text{TGF-}\beta_1$ (40 pM), otro agente diferenciador de los osteoblastos, el 70 % de las células osteoblásticas fueron fosfatasa alcalina positivas (**Fig. 16**).

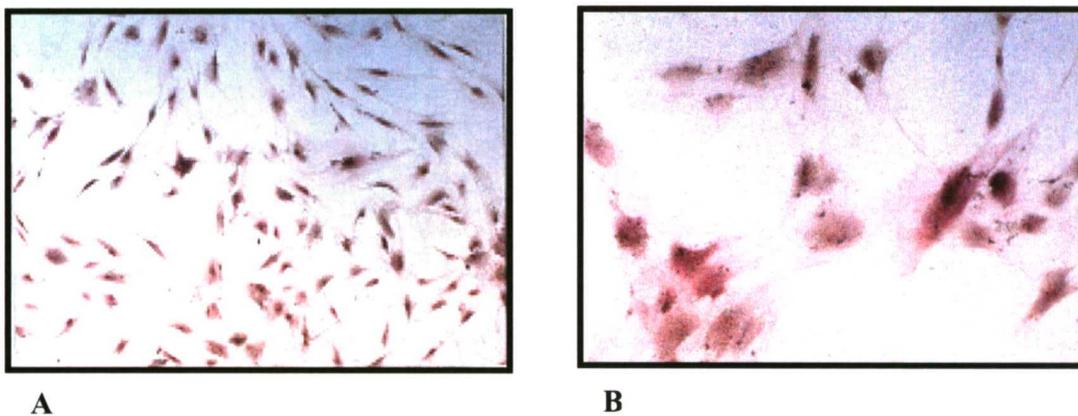


Fig. 16. Tinción citoquímica para la fosfatasa alcalina en cultivo primario de OB humanos. Estos cultivos fueron tratados en ausencia (A) o presencia de 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y 40 pM de $\text{TGF-}\beta_1$ (B) durante 72 horas en medio sin suero.

También se determinó la secreción de PIIINP, un marcador fibroblástico, con el fin de determinar la posible contaminación con este tipo de células. Los resultados muestran que sólo el 10 % del procolágeno total detectado era PIIINP.

Así pues, concluimos que la mayoría de las células de nuestros cultivos poseen un fenotipo osteoblástico.

4. DIFERENCIAS EN LA PROLIFERACIÓN OSTEoblástica SEGÚN EL TAMAÑO Y COMPOSICIÓN DE LAS PARTÍCULAS, POLIETILENO O ALÚMINA

- Efecto del polietileno y la alúmina, ambos < 160 µm, sobre la proliferación celular

A los nueve días después de la siembra en las placas multipocillo, las células osteoblásticas incubadas con polietileno < 160 µm presentaban un descenso en el crecimiento celular osteoblástico. Sin embargo, la adición de alúmina < 160 µm no inhibió el crecimiento durante el período de observación (Tabla 5).

Biomaterial. o control	Nº cultivos celulares	Nº de células ×(1.000)			
		3 días	6 días	9 días	13 días
Control	12	20±6	28±9	42±15	55±25
Polietileno	12	16±5	26±9	27±8*	45±23
Alúmina	12	19±5	22±8	32±11	45±23

Tabla 5. Efecto del polietileno y la alúmina, < 160 µm, en el crecimiento osteoblástico. La proliferación celular fue determinada mediante contaje directo en cámara de Neubauer a los 3, 6, 9 y 13 días después de la siembra en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con partículas de polietileno o alúmina. Los valores son expresados en (nº de células x 1000) como la media ± DE.

* p< 0.05 comparado con los cultivos control.

Cuando se calculó el área bajo la curva a lo largo de todo el período de cultivo, se observó que el descenso era significativo sólo en los cultivos tratados con polietileno al compararlos con los cultivos control (Fig. 17).

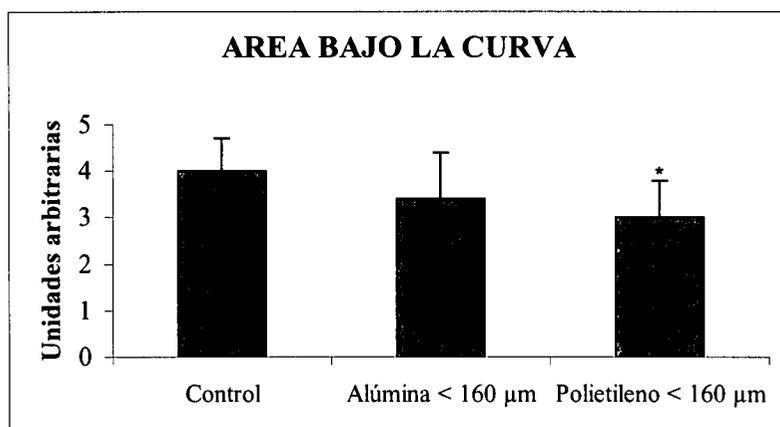


Fig. 17. Área bajo la curva (ABC) de la proliferación celular. La proliferación celular fue determinada por conteo en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con polietileno o alúmina < 160 μm.
*p<0.05, comparado con los cultivos control.

- Efecto del polietileno y la alúmina, ambos < 80 μm, sobre la proliferación celular

Los cultivos incubados con polietileno < 80 μm mostraron menor crecimiento que aquéllos en los que no se añadió biomaterial (Control) a los 3, 9 y 13 días. La alúmina < 80 μm también indujo un descenso en el crecimiento pero sólo a los 3 y a los 9 días (Tabla 6).

Biomaterial o control	Nº cultivos celulares	Nº de células ×(1.000)			
		3 días	6 días	9 días	13 días
Control	6	16±2	21±8	36±10	41±15
Polietileno	6	10±2**	19±5	25±6*	27±6*
Alúmina	6	11±3*	21±9	28±9*	36±5

Tabla 6. Efecto del polietileno y la alúmina, < 80 μm, en el crecimiento osteoblástico. La proliferación celular fue determinada mediante conteo directo en cámara de Neubauer a los 3, 6, 9 y 13 días después de la siembra en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con partículas de polietileno o alúmina. Los valores son expresados en (nº de células x 1000) como la media ± DE.
*p< 0.05; **p<0.01 comparado con los cultivos control.

El área bajo la curva disminuyó en los cultivos tratados con polietileno y en los tratados con alúmina, pero el descenso fue menos acusado en este último caso (Fig. 18).

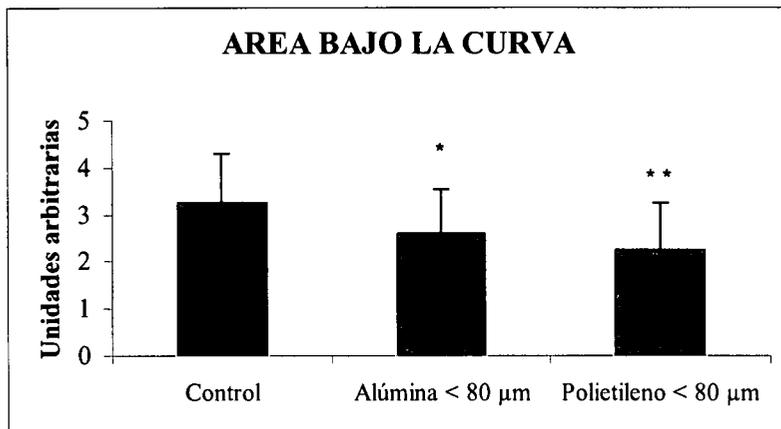


Fig. 18. Área bajo la curva (ABC) de la proliferación celular. La proliferación celular fue determinada por conteo en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con polietileno o alúmina < 80 μm.

*p<0.05; **p<0.01, comparado con los cultivos control.

- Efecto del polietileno, < 160 μm y < 80 μm, sobre la proliferación celular

Comparando el área bajo la curva de los cultivos en los que fue añadido polietileno, < 160 μm o < 80 μm, respecto a los que no se añadió biomaterial (Control), se observó que la inhibición del crecimiento fue mayor con el polietileno de menor tamaño, < 80 μm (Fig. 19).

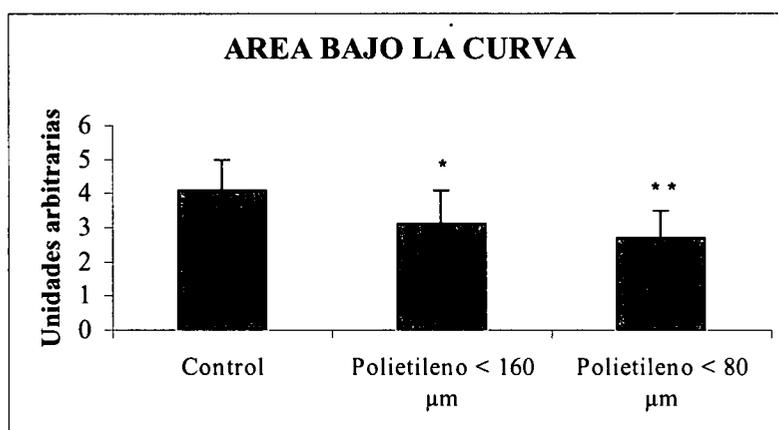


Fig. 19. Área bajo la curva (ABC) de la proliferación celular. La proliferación celular fue determinada por conteo en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con polietileno < 160 μm o < 80 μm.

*p<0.05; **p<0.01, comparado con los cultivos control.

5. DIFERENCIAS EN LA SECRECIÓN DE PICP, FOSFATASA ALCALINA Y OSTEOCALCINA EN OB HUMANOS SEGÚN EL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS DE POLIETILENO

• Efecto del polietileno, < 30 μm y < 160 μm , en la secreción de PICP

Los niveles de PICP en el medio celular condicionado de los cultivos sin la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Basal), disminuyeron al ser tratados con polietileno < 30 μm respecto a los cultivos sin partículas (Control). Sin embargo, el tratamiento con polietileno < 160 μm , no modificó la concentración de PICP en el medio condicionado (**Fig. 20**).

La adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ disminuyó la secreción de PICP en los cultivos controles, pero no afectó a los cultivos incubados con polietileno de ambos tamaños de partícula (**Fig. 20**). Sin embargo, al comparar los cultivos a los que fue añadido $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bajo tratamiento con polietileno < 30 μm con los controles, se observó un descenso en la secreción de PICP (**Fig. 20**).

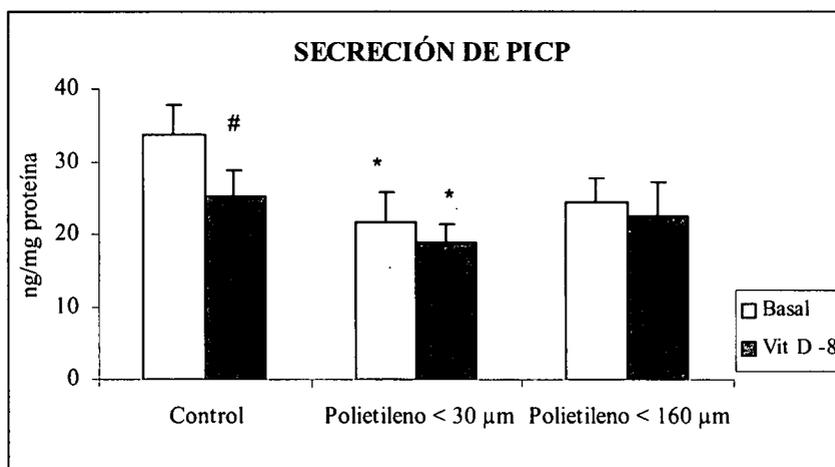


Fig. 20. Efecto del tamaño de la partícula de polietileno sobre la secreción de PICP basal y en respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La secreción de PICP fue determinada en el medio celular condicionado de OB humanos en cultivo primario ($n = 10$), en ausencia (Basal) y en presencia de 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con partículas de polietileno de dos tamaños, < 30 μm y < 160 μm . Los resultados se expresan como la media \pm ES.

(#) $p < 0.05$, entre cultivos basales y tras la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en el mismo grupo.

(*) $p < 0.05$, entre cultivos tratados con polietileno y cultivos control (no tratados).

• Efecto del polietileno, < 30 μm y < 160 μm , en la secreción de Fosfatasa Alcalina

El polietileno no afectó a la secreción de fosfatasa alcalina en los cultivos en situación basal (**Fig. 21**).

La adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mantuvo invariables los niveles de fosfatasa alcalina en el medio celular condicionado, tanto en los cultivos control, como en los tratados con polietileno, al compararlos con los niveles basales correspondientes. Igualmente, el polietileno no afectó a la secreción de fosfatasa alcalina en los cultivos a los que se añadió $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con respecto a sus respectivos controles (**Fig. 21**).

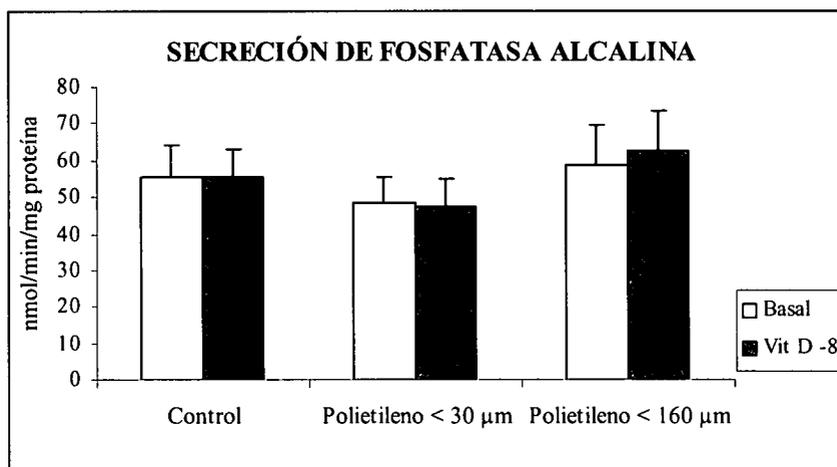


Fig. 21. Efecto del tamaño de la partícula de polietileno sobre la secreción de fosfatasa alcalina basal y en respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La secreción de fosfatasa alcalina fue determinada en el medio celular condicionado de OB humanos en cultivo primario ($n = 10$), en ausencia (Basal) y en presencia de $10 \text{ nM } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con partículas de polietileno de dos tamaños, < 30 μm y < 160 μm . Los resultados se expresan como la media \pm ES.

Efecto del polietileno, < 30 μm y < 160 μm , en la secreción de Osteocalcina

La concentración de osteocalcina en el medio condicionado de las células osteoblásticas en situación basal, fue similar en los cultivos tratados con polietileno de ambos tamaños de partícula comparados con los cultivos no tratados (Control) (**Fig. 22**).

Después de la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ los niveles de osteocalcina aumentaron significativamente en todos los cultivos, y este incremento fue mayor en presencia de

partículas de polietileno < 30 μm al compararlo con el de los cultivos control, y los tratados con partículas de polietileno < 160 μm (Fig. 22).

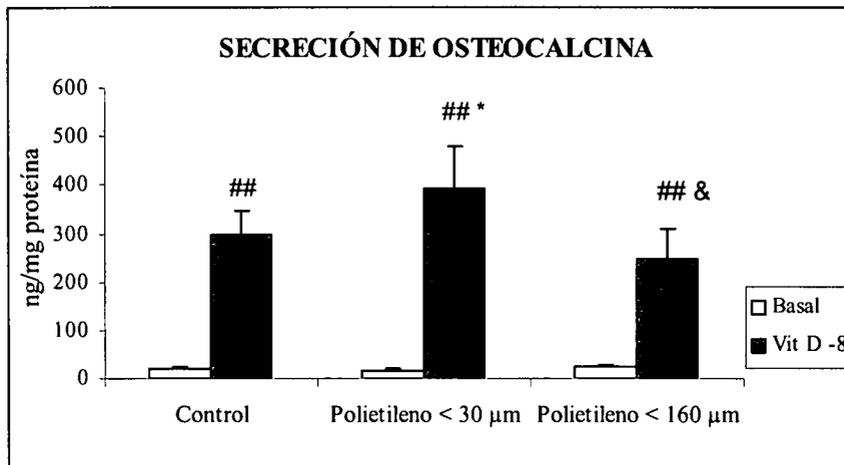


Fig. 22. Efecto del tamaño de la partícula de polietileno sobre la secreción de osteocalcina basal y en respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La secreción de osteocalcina fue determinada en el medio celular condicionado de OB humanos en cultivo primario ($n = 10$), en ausencia (Basal) y en presencia de 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con partículas de polietileno de dos tamaños, < 30 μm y < 160 μm . Los resultados se expresan como la media \pm ES. (##) $p < 0.001$, entre cultivos basales y tras la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en el mismo grupo. (*) $p < 0.05$, entre cultivos tratados con polietileno y cultivos control (no tratados). (&) $p < 0.05$ entre cultivos tratados con polietileno < 30 μm y < 160 μm .

6. DIFERENCIAS EN LA SECRECIÓN DE PICP, FOSFATASA ALCALINA Y OSTEOCALCINA EN OB HUMANOS SEGÚN EL TAMAÑO Y COMPOSICIÓN DE LAS PARTÍCULAS, MA 956 O ALÚMINA

- Efecto del MA 956 y la alúmina, < 10 μm y < 80 μm , en la secreción de PICP

La secreción de PICP por las células osteoblásticas al medio condicionado en situación basal, disminuyó en presencia de partículas de MA 956 y de alúmina de ambos tamaños, < 10 μm y < 80 μm , comparado con los cultivos sin partículas (Control). Este efecto fue más marcado con las partículas de MA 956 y en especial con las más pequeñas más pequeñas [Fig. 23 (A, B)].

La adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ produjo un descenso en los niveles de PICP en los cultivos control de la serie de la alúmina (Fig. 23 B). No se observaron diferencias entre

los cultivos a los que se añadió $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en presencia de partículas, al ser comparados con los cultivos control [Fig. 23 (A, B)].

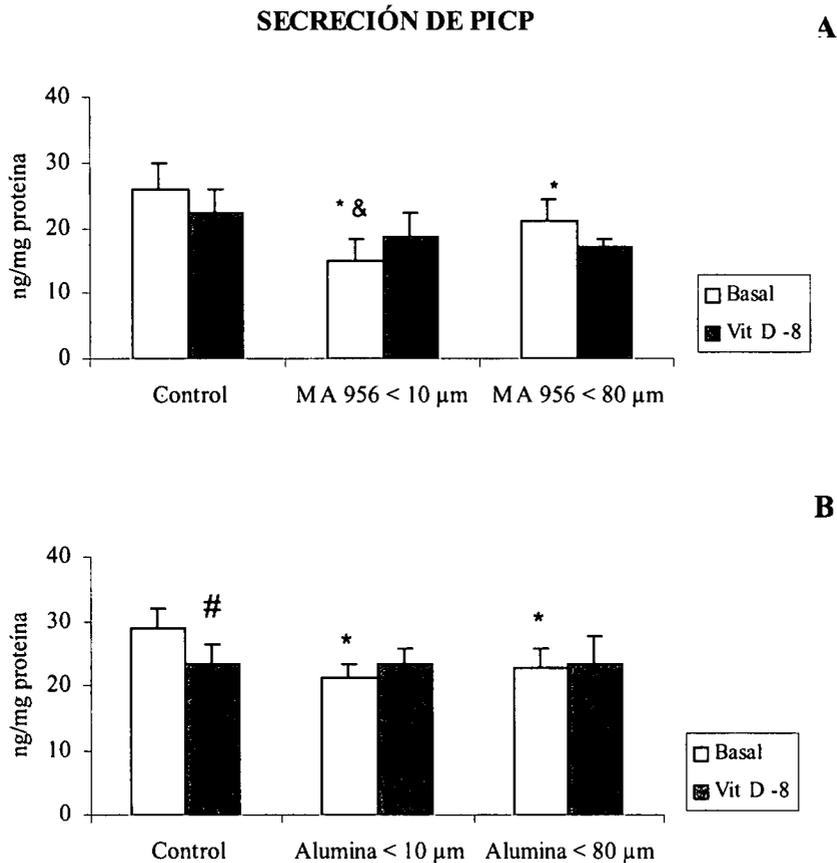


Fig. 23. Efecto del tamaño y de la composición de la partícula sobre la secreción de PICP basal y en respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La secreción de PICP fue determinada en el medio celular condicionado de OB humanos en cultivo primario, en ausencia (Basal) y en presencia de 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con partículas de MA 956 (A) $n = 11$ y de alúmina (B) $n = 7$ de dos tamaños, $< 10 \mu\text{m}$ y $< 80 \mu\text{m}$. Los resultados se expresan como la media \pm ES. (#) $p < 0.05$, entre cultivos basales y tras la adición $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en el mismo grupo. (*) $p < 0.05$, entre cultivos tratados con partículas y cultivos control (no tratados). (&) $p < 0.05$, entre cultivos tratados con MA 956 $< 10 \mu\text{m}$ y $< 80 \mu\text{m}$.

• Efecto del MA 956 y la alúmina, $< 10 \mu\text{m}$ y $< 80 \mu\text{m}$, en la secreción de Fosfatasa Alcalina

Ni el tratamiento con partículas de MA 956 de ambos tamaños ni con partículas de alúmina $< 80 \mu\text{m}$ afectó a la secreción de fosfatasa alcalina al medio condicionado en

situación basal [Fig. 24 (A, B)]. Sin embargo, las partículas de alúmina < 10 μm disminuyeron la actividad de la fosfatasa alcalina basal con respecto a los cultivos control (Fig. 24 B).

Tras la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ los niveles de fosfatasa alcalina aumentaron en los cultivos control de ambas series al compararlos con los niveles basales correspondientes [Fig. 24 (A, B)]. Sólo la alúmina < 10 μm indujo un descenso en la secreción de fosfatasa alcalina en los cultivos a los que se añadió $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Fig. 24 B).

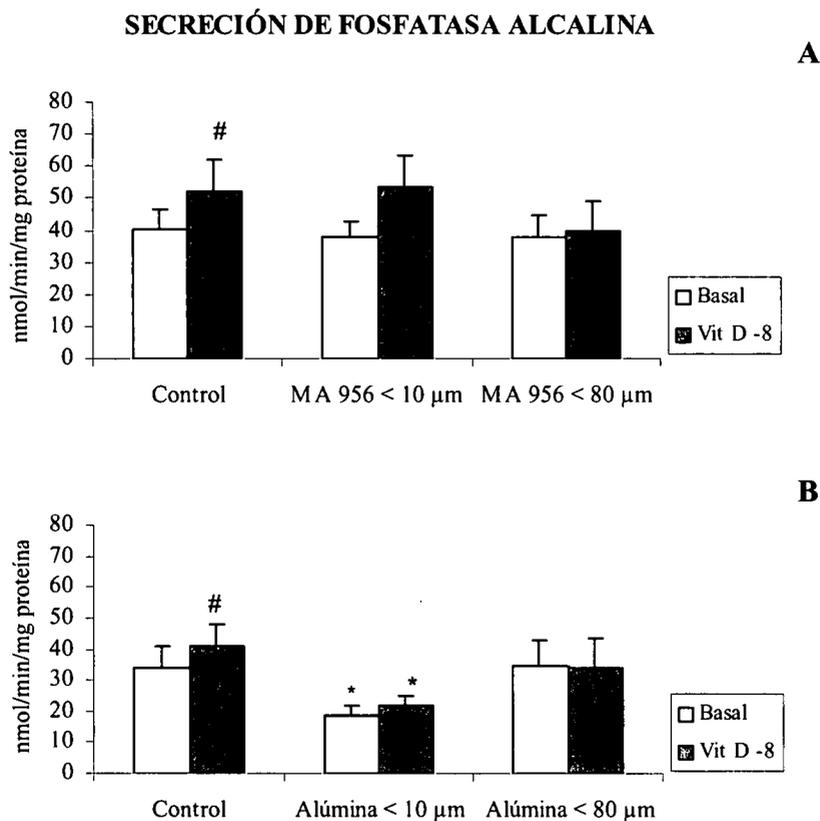


Fig. 24. Efecto del tamaño y de la composición de la partícula sobre la secreción de fosfatasa alcalina basal y en respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La secreción de fosfatasa alcalina fue determinada en el medio celular condicionado de OB humanos en cultivo primario, en ausencia (Basal) y en presencia de 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con partículas de MA 956 (A) $n = 11$ y de alúmina (B) $n = 7$ de dos tamaños, < 10 μm y < 80 μm . Los resultados se expresan como la media \pm ES.

(#) $p < 0.05$, entre cultivos basales y tras la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en el mismo grupo.

(*) $p < 0.05$, entre cultivos tratados con alúmina y cultivos control (no tratados).

• Efecto del MA 956 y la alúmina, < 10 μm y < 80 μm , en la secreción de Osteocalcina

La secreción de osteocalcina en situación basal fue similar en todos los cultivos. [Fig. 25 (A, B)].

Después de la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ la secreción de osteocalcina aumentó en todos los cultivos, con y sin tratamiento de ambos biomateriales [Fig. 25 (A, B)]. Sin embargo, las partículas de MA 956 < 10 μm atenuaron el aumento en la secreción de osteocalcina en los cultivos a los que se añadió $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, al compararlos con los niveles de los cultivos controles, no tratados (Fig. 25 A).

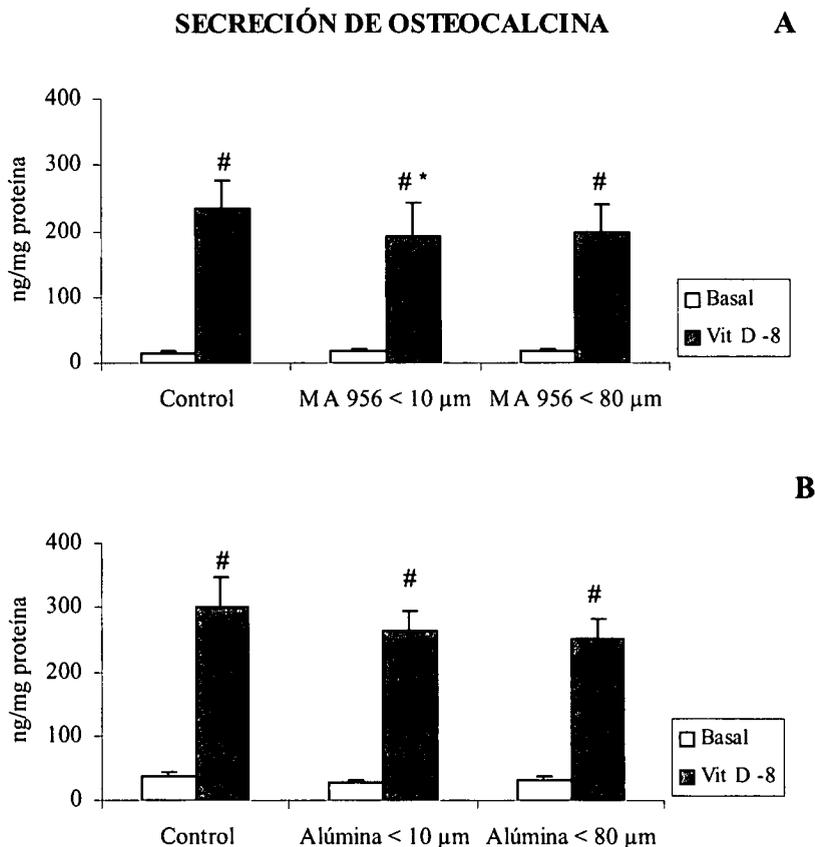


Fig. 25. Efecto del tamaño y de la composición de la partícula sobre la secreción de osteocalcina basal y en respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La secreción de osteocalcina fue determinada en el medio celular condicionado de OB humanos en cultivo primario, en ausencia (Basal) y en presencia de 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con partículas de MA 956 (A) $n = 11$ y de alúmina (B) $n = 7$ de dos tamaños, < 10 μm y < 80 μm . Los resultados se expresan como la media \pm ES.

(#) $p < 0.05$, entre cultivos basales y tras la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en el mismo grupo.

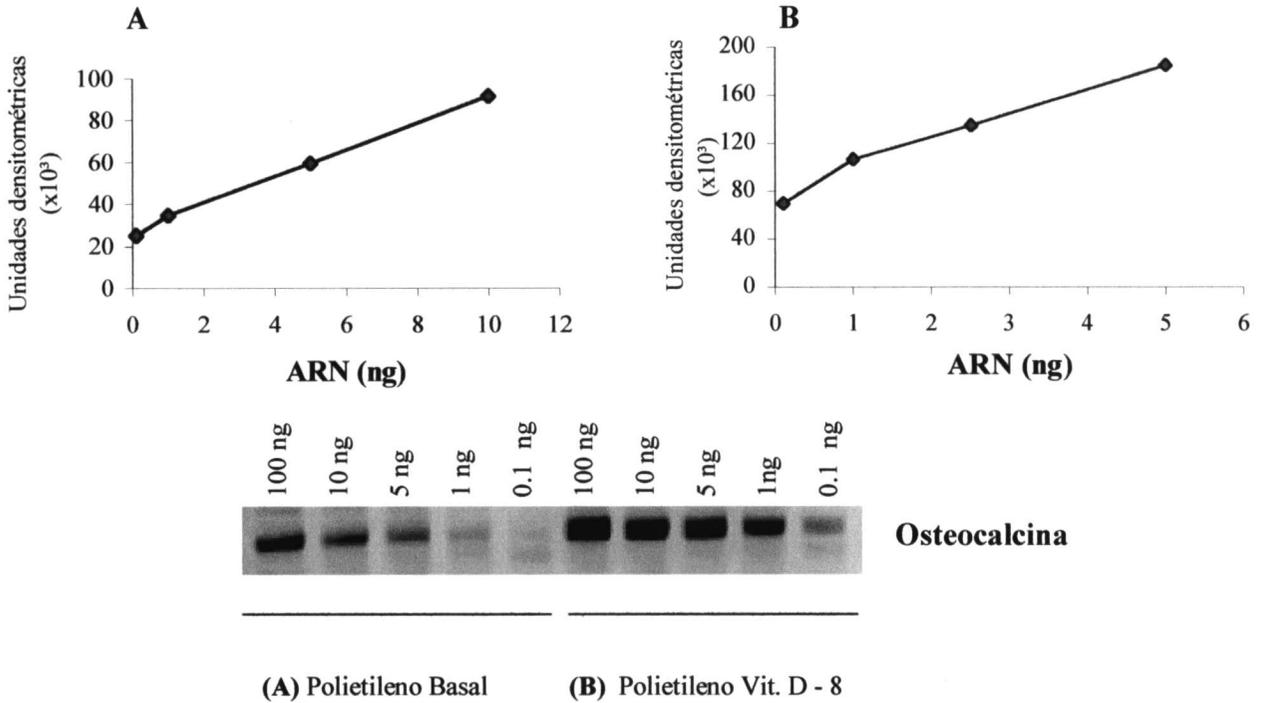
(*) $p < 0.05$, entre cultivos tratados con Ma 956 y cultivos control (no tratados).

7. EFECTOS DE LAS PARTÍCULAS DE POLIETILENO SOBRE LA EXPRESIÓN DE OSTEOCALCINA EN OB HUMANOS EN CULTIVO PRIMARIO

Determinamos la expresión de la osteocalcina mediante RT-PCR tras el tratamiento de las células osteoblásticas con partículas de polietileno < 30 μm .

Para asegurar que las condiciones de amplificación eran submáximas y no había saturación de la señal, realizamos dos curvas de titulación a partir del ARN total procedente de cinco cultivos primarios de OB humanos. El ARN utilizado para una de las curvas procedía de un pool de los cinco cultivos tratados con polietileno en ausencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y el ARN utilizado para la otra curva procedía de un segundo pool de los mismos cinco cultivos tratados con polietileno y 10 nM de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Se hicieron las respectivas curvas de titulación que nos sirvieron para conocer el rango lineal en el que no existe saturación de la señal. Se utilizó 1 ng de ARN total tanto para los cultivos no estimulados (**Fig. 26 A**) como para los estimulados con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (**Fig. 26 B**). Sin embargo, en algunos cultivos estimulados el sistema de amplificación se saturaba, por ello, la cantidad de ARN total añadida a la mezcla de reacción fue de 0.1 ng en todos los cultivos estimulados. En los cultivos basales se comprobó que 0.1 ng de ARN total era una cantidad insuficiente ya que no se obtenía señal, así la cantidad utilizada en este caso fue de 1 ng. Al igual que para la osteocalcina, se realizó una curva de titulación para conocer la cantidad de ARN total necesario para amplificar el gen de la GAPDH, que será utilizado como control constitutivo. Los resultados óptimos se obtuvieron con 1 ng en todos los cultivos (**Fig. 26 C**).

EXPRESIÓN DE OSTEOCALCINA



EXPRESIÓN DE GAPDH

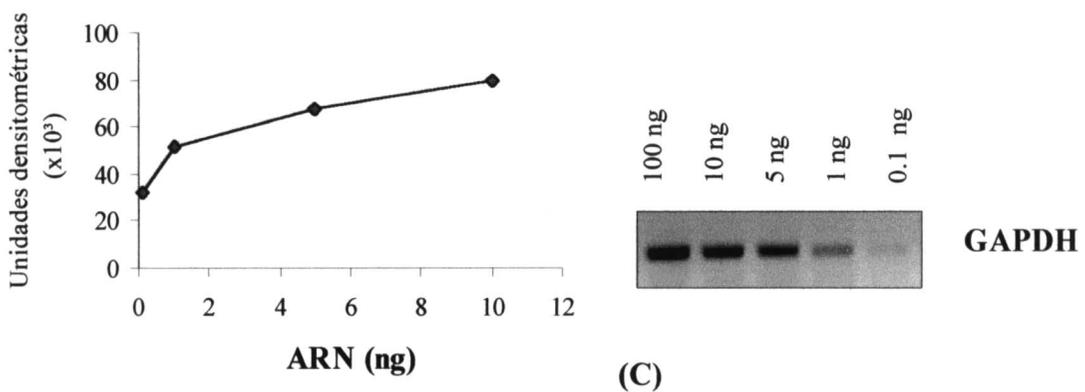


Fig. 26. Curvas de titulación para la osteocalcina (A y B) y para la GAPDH (C). La expresión de estos genes fue determinada mediante RT-PCR semicuantitativa en un pool de OB humanos de cinco cultivos primarios tratados con partículas de polietileno en ausencia (Basal) (A) y estimulados con 10 nM 1,25(OH)₂D₃ (Vit D -8) (B).

La adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ incrementó la expresión de osteocalcina en los cultivos control y en los tratados con polietileno $< 30 \mu\text{m}$ (**Fig. 27**). Se observó que las partículas de polietileno incrementaron la expresión de osteocalcina basal y tras la estimulación con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, respecto a los cultivos no tratados (**Fig. 27**).

EXPRESIÓN DE OSTEOCALCINA

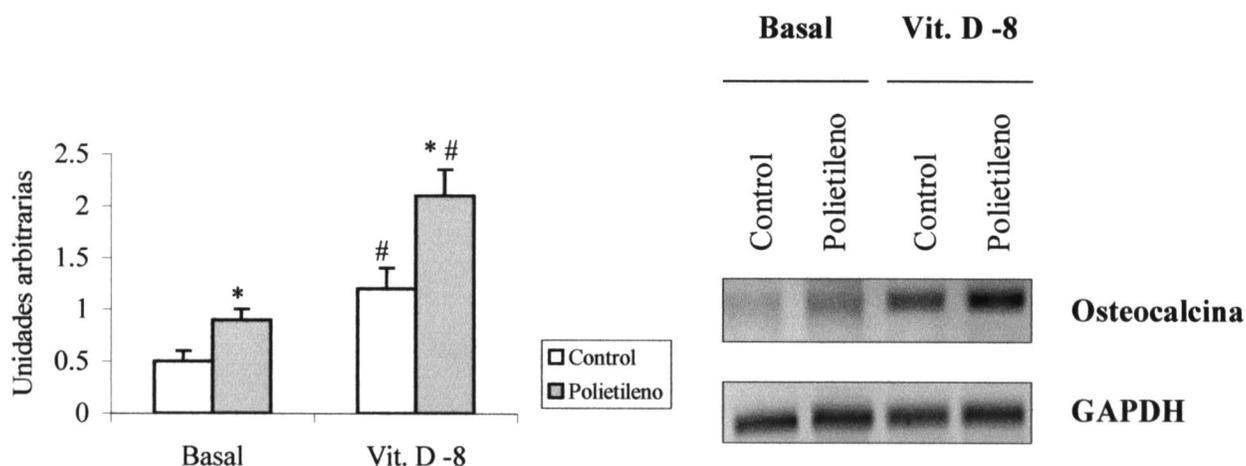


Fig. 27. Efecto de las partículas de polietileno $< 30 \mu\text{m}$ sobre la expresión de osteocalcina basal y en respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La expresión de osteocalcina fue determinada por RT-PCR semicuantitativa en OB humanos procedentes de 7 cultivos primarios, en ausencia (Basal) y en presencia de $10 \text{ nM } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D -8) en cultivos no tratados (Control) y en cultivos tratados con partículas de polietileno $< 30 \mu\text{m}$. Gel representativo de un cultivo. Los resultados se expresan como la media \pm ES. * $p < 0.05$, respecto a los cultivos control. # $p < 0.05$, respecto a los cultivos en situación basal.

8. EFECTOS DE LAS PARTÍCULAS DE POLIETILENO Y ALÚMINA EN LA SÍNTESIS DE IL-6 EN OB HUMANOS EN CULTIVO PRIMARIO

- Efecto de las partículas de polietileno y alúmina $< 5 \mu\text{m}$ en la expresión de IL-6 en células osteoblásticas humanas

Para asegurar condiciones de amplificación submáximas en la RT-PCR, realizamos curvas de titulación de cantidades de ARNm pertenecientes a OB procedentes de tres

cultivos primarios, sin tratar con partículas de polietileno (Control) y tratados durante 24 horas con 50 mg/pocillo de partículas de polietileno.

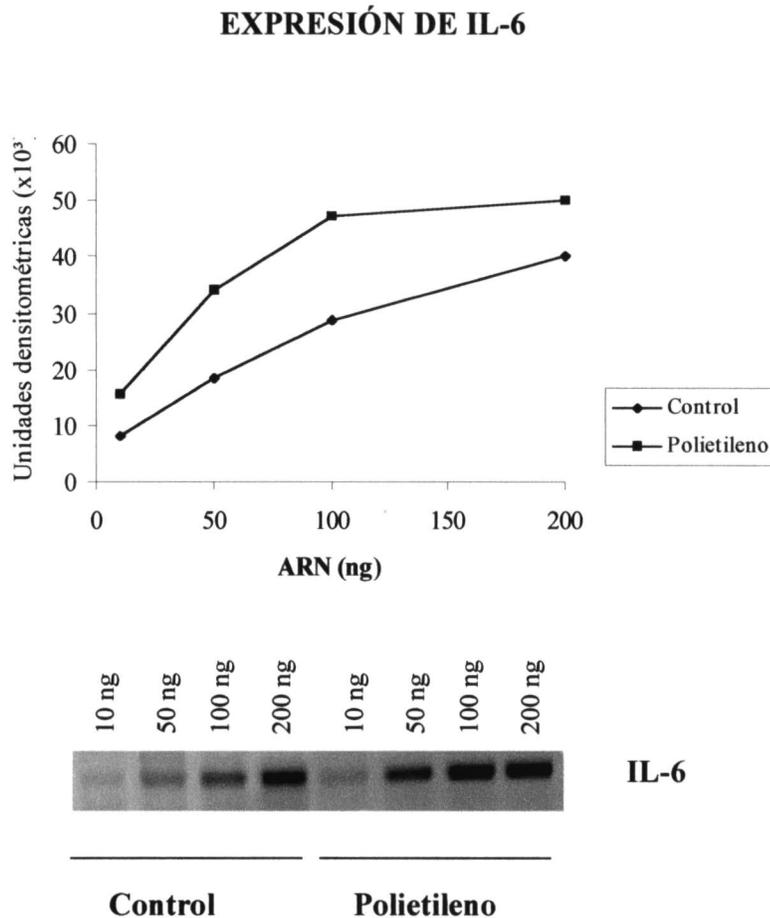


Fig. 28. Titulación de la expresión del gen de la IL-6. La expresión de la IL-6 fue determinada mediante RT-PCR semicuantitativa en tres cultivos primarios de OB humanos no tratados (Control) o tratados con 50 mg/pocillo de partículas de polietileno durante 24 horas en medio libre de suero. Gel representativo perteneciente al ARNm de la IL-6 de un cultivo.

La **Fig. 28** muestra que con 50 ng de ARN total no existe saturación de la señal del ARNm de la IL-6, ni en los cultivos control, no tratados, ni tras la incubación con polietileno. Así pues, los experimentos posteriores de expresión de IL-6 se realizaron con 50 ng de ARN total tanto en los cultivos control, como en los incubados con partículas de polietileno o de alúmina. Además se coamplificó el gen constitutivo de la GAPDH, que se utilizó como control a partir de 1 ng de ARN total (apartado 6).

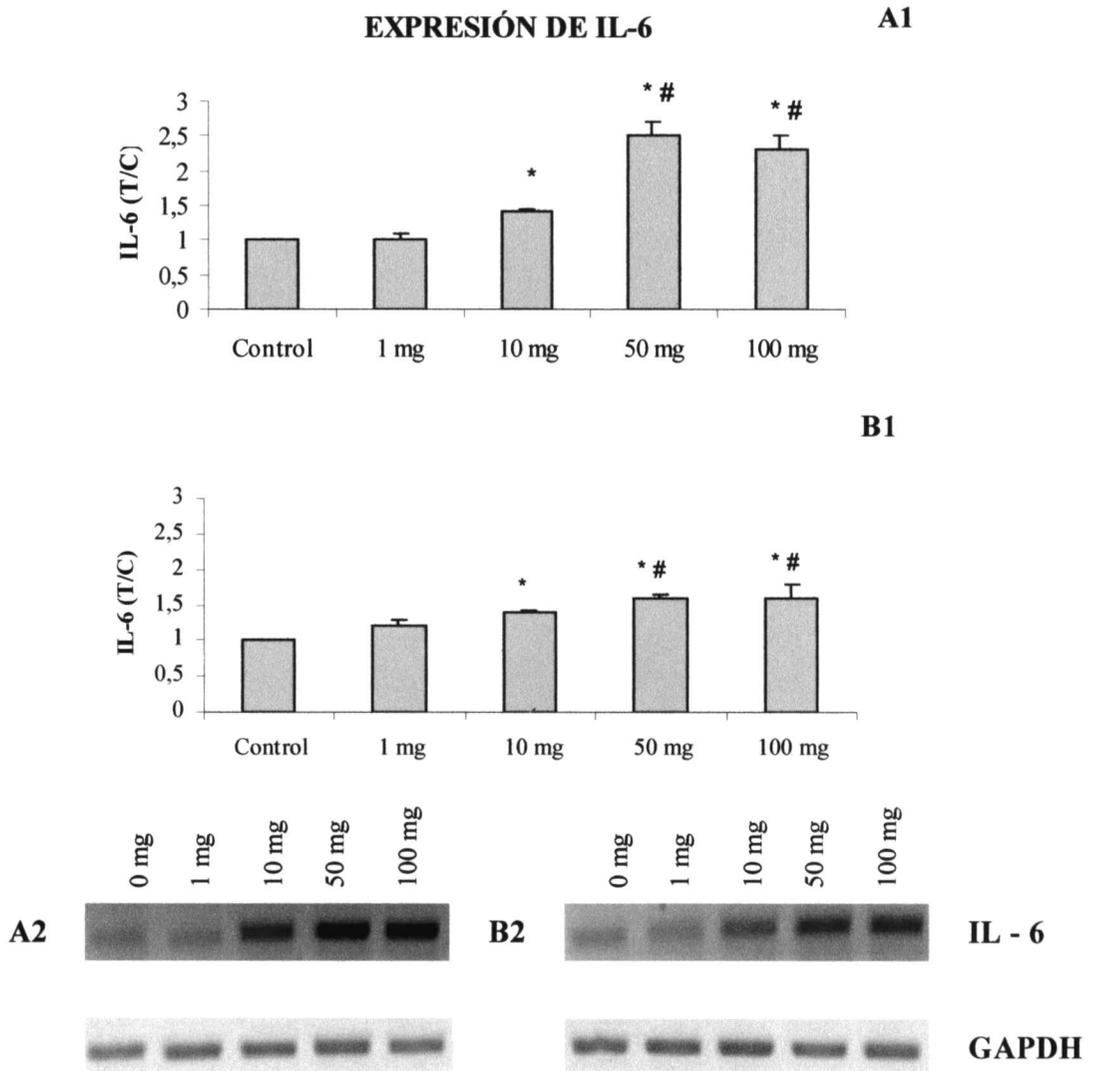


Fig. 29. Efecto de diferentes dosis de partículas de polietileno y alúmina en la expresión de IL-6. La expresión de IL-6 fue determinada por RT-PCR semicuantitativa en tres cultivos primarios de OB humanos no tratados (Control) o tratados con partículas de polietileno (A1) o con partículas de alúmina (B1) desde 1 hasta 100 mg/pocillo durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media \pm ES del cociente entre los cultivos tratados (T) y los cultivos control (C) no tratados, corregidos por sus correspondientes valores de GAPDH. Gel representativo perteneciente al ARNm de la IL-6 de un cultivo tratado con polietileno (A2) y con alúmina (B2).

* $p < 0.05$, respecto al Control.

$p < 0.05$, respecto a 10 mg/pocillo.

La incubación de las células osteoblásticas con concentraciones crecientes de partículas de polietileno (Fig. 29 A) o alúmina (Fig. 29 B) comprendidas entre 1 y 100 mg/pocillo, produjo un incremento en la expresión de IL-6 con respecto al Control,

comenzando a la dosis de 10 mg/pocillo. Se alcanzó el valor máximo con la concentración de 50 mg/pocillo, con ambos biomateriales, manteniéndose estable.

Posteriormente, se estudió el efecto de la composición a la dosis de 50 mg/pocillo, utilizando nueve cultivos primarios de OB humanos tratados con polietileno y otros seis tratados con alúmina. Observamos que la expresión de IL-6 fue mayor después de la adición de las partículas de polietileno que tras la adición de las partículas de alúmina (Fig. 30).

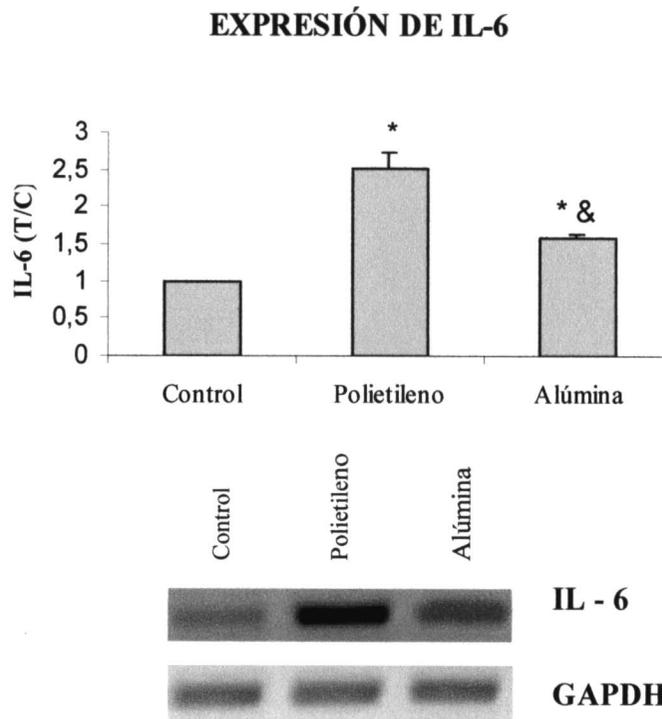


Fig. 30. Efecto de la composición de la partícula, polietileno o alúmina, en la expresión de IL-6. La expresión de IL-6 fue determinada por RT-PCR semicuantitativa en OB humanos en cultivo primario no tratados (Control) y tratados con 50 mg/pocillo de partículas de polietileno ($n = 9$), o con 50 mg/pocillo de partículas de alúmina ($n = 6$), durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media \pm ES del cociente entre los cultivos tratados (T) y los cultivos control (C) no tratados, corregidos por sus correspondientes valores de GAPDH. Gel representativo perteneciente al ARNm de la IL-6 de un cultivo control o tratado con polietileno o alúmina.

* $p < 0.05$, respecto al Control.

& $p < 0.05$, Alúmina respecto a Polietileno.

- Efecto de las partículas de polietileno y alúmina < 5 µm en la secreción de IL-6 en células osteoblásticas humanas

La secreción de IL-6 fue determinada en el medio condicionado de los cultivos utilizados previamente para determinar la expresión génica. La incubación de las células osteoblásticas con concentraciones crecientes de partículas de polietileno produjo un incremento en la secreción de IL-6 respecto al control, comenzando con la dosis de 10 mg/pocillo y alcanzándose el valor máximo a la dosis de 50 mg/pocillo (**Fig. 31 A**). En el caso de la alúmina, con 10 mg/pocillo también aumentó la secreción de IL-6, siendo ésta la dosis de máxima respuesta (**Fig. 31 B**).

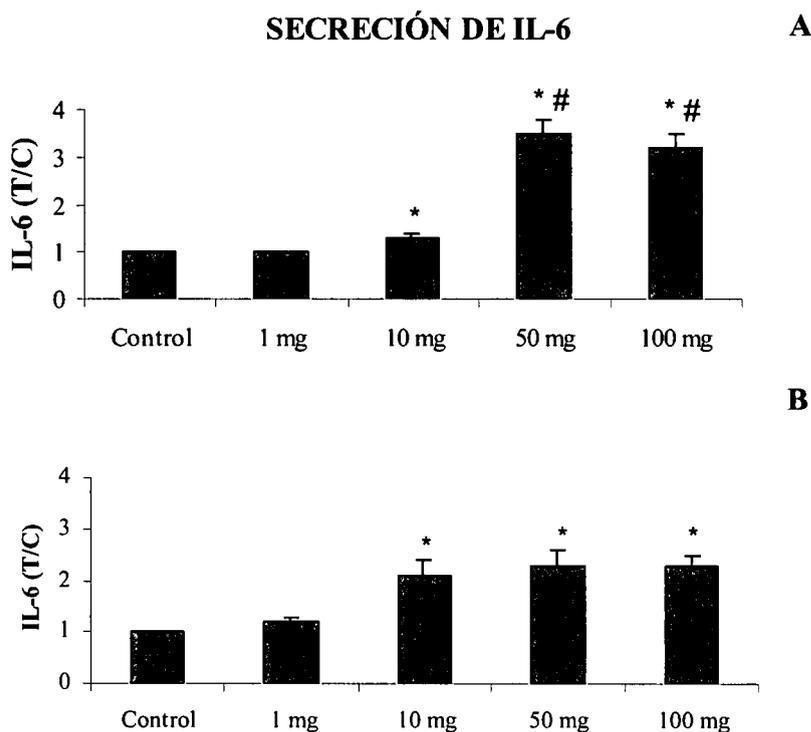


Fig. 31. Efecto de diferentes dosis de partículas de polietileno y de alúmina en la secreción de IL-6. La secreción de IL-6 fue determinada en el medio celular condicionado de tres cultivos primarios de OB humanos no tratados (Control) y tratados con partículas de polietileno (A) o con partículas de alúmina (B) desde 1 hasta 100 mg/pocillo, durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media \pm ES del cociente entre los cultivos tratados (T) y los cultivos control (C) no tratados.
* $p < 0.05$, respecto al Control.
$p < 0.05$, respecto a 10 mg/pocillo.

Los efectos de 10 mg/pocillo y 50 mg/pocillo fueron estudiados utilizando nueve cultivos primarios de OB humanos tratados con polietileno y otros seis tratados con alúmina. La **Fig. 32 A** muestra que 10 mg/pocillo de partículas de alúmina inducen una

mayor secreción de IL-6 que la misma dosis de partículas de polietileno (Fig. 32 A). Por el contrario, con la dosis de 50 mg/pocillo, el polietileno indujo mayor secreción de IL-6 de las células osteoblásticas que la alúmina (Fig. 32 B).

SECRECIÓN DE IL-6

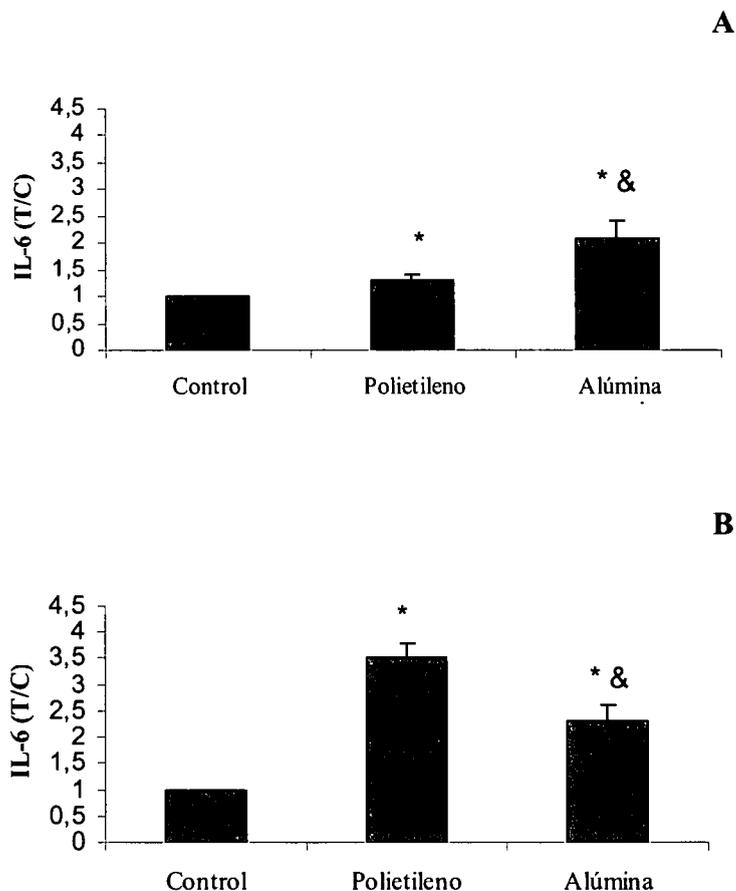


Fig. 32. Efecto de la composición de la partícula, polietileno o alúmina, en la secreción de IL-6. La secreción de IL-6 fue determinada en el medio celular condicionado de OB humanos en cultivo primario no tratados (Control) y tratados con 10 mg/pocillo (A) o con 50 mg/pocillo (B) de partículas de polietileno (n = 9) o de partículas de alúmina (n = 6), durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media \pm ES del cociente entre los cultivos tratados (T) y los cultivos control (C) no tratados.

*p<0.05, respecto al Control.

&p<0.05, alúmina respecto a polietileno.

9. EFECTOS DE LAS PARTÍCULAS DE ALÚMINA < 5 μm SOBRE LA SECRECIÓN DE VARIAS CITOQUINAS EN EL COCULTIVO OB HUMANO – MACRÓFAGO DE RATÓN

- Determinación de la dosis que produce la máxima liberación de citoquinas

➤ *Secreción de TNF-α por los macrófagos murinos*

Los macrófagos fueron incubados con distintas dosis de partículas de alúmina desde 1 hasta 100 mg/pocillo, incrementándose los niveles de TNF-α hasta un valor máximo respecto a la situación basal, cuando se añadieron partículas a una concentración de 50 mg/pocillo (Fig. 33).

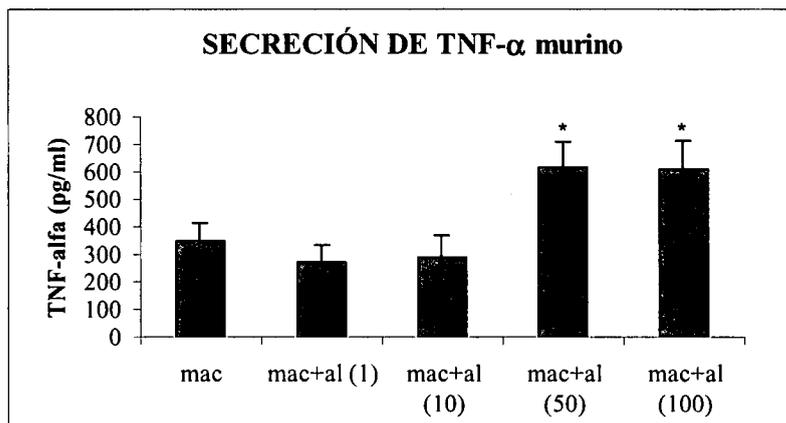


Fig. 33. Efecto de la concentración de las partículas de alúmina en la secreción de TNF-α por los macrófagos J774. La secreción de TNF-α fue determinada en el medio celular condicionado de los macrófagos no tratados (mac) y tratados con partículas de alúmina (mac+al) desde 1 hasta 100 mg/pocillo, durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media ± ES (n = 3).

*p<0.05, respecto a mac.

➤ *Secreción de GM-CSF por los OB humanos*

La incubación de OB y macrófagos con dosis de partículas de alúmina comprendidas entre 1 y 100 mg/pocillo incrementó la liberación de GM-CSF desde la concentración de 10 mg/pocillo. Sin embargo, con la dosis de 50 mg/pocillo se produjo la máxima estimulación (**Fig. 34**).

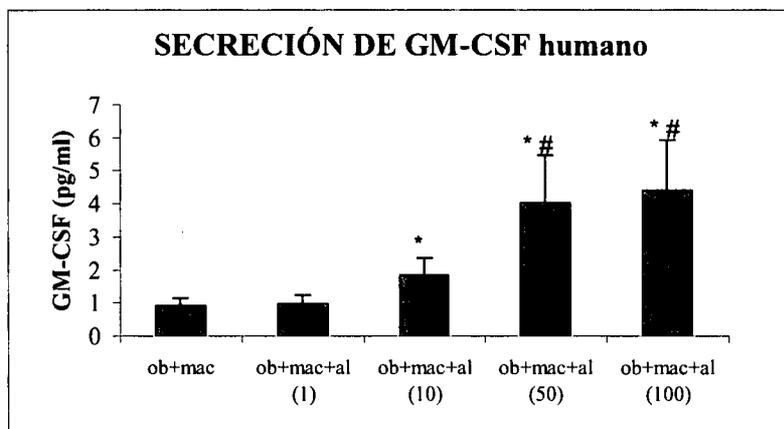


Fig. 34. Efecto de la concentración de las partículas de alúmina en la secreción de GM-CSF por los OB humanos en cocultivo con macrófagos J774. La secreción de GM-CSF fue determinada en el medio celular condicionado de los OB en cocultivo con macrófagos no tratados (ob+mac) y tratados con partículas de alúmina (ob+mac+al) desde 1 hasta 100 mg/pocillo, durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media \pm ES (n = 3).

*p<0.05, respecto a ob+mac.

#p<0.05, respecto a la dosis de 10 mg/pocillo.

➤ *Secreción de IL-6 por los OB humanos*

El tratamiento de OB y macrófagos con las distintas dosis de partículas de alúmina indujo un aumento en la secreción de IL-6 que comenzó a ser significativo con la dosis de 10 mg/pocillo y que fue máximo a la dosis de 50 mg/pocillo, comparado con el sistema de cocultivo en ausencia de partículas (**Fig. 35**).

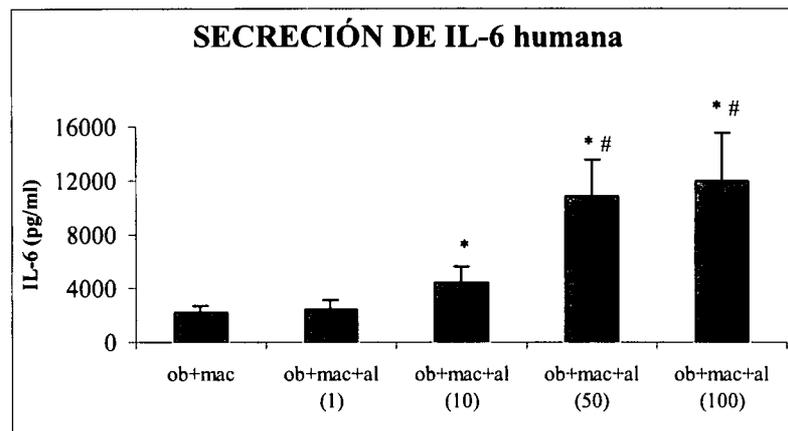


Fig. 35. Efecto de la concentración de las partículas de alúmina en la secreción de IL-6 por los OB humanos en cocultivo con macrófagos J774. La secreción de IL-6 fue determinada en el medio celular condicionado de los ob en cocultivo con macrófagos no tratados (ob+mac) y tratados con partículas de alúmina (ob+mac+al) desde 1 hasta 100 mg/pocillo, durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media \pm ES (n = 3).

*p<0.05, respecto a ob+mac.

#p<0.05, respecto a la dosis de 10 mg/pocillo.

- Secreción de citoquinas en el cocultivo de OB y macrófagos tratados o no con 50 mg/pocillo de partículas de alúmina

a) Liberación de mediadores por los macrófagos

➤ Secreción de TNF- α murino

Las partículas de alúmina estimularon la secreción de TNF- α respecto a los macrófagos en ausencia de partículas (**Fig. 36**).

La producción de TNF- α por los macrófagos en el sistema macrófago-OB fue menor que en los macrófagos aislados (**Fig. 36**). La adición de partículas de alúmina al cocultivo macrófago-OB, indujo un aumento en la liberación de TNF- α , respecto al sistema de cocultivo en ausencia de partículas. Sin embargo, los niveles de TNF- α en dicho cocultivo con partículas fueron menores a los observados en los macrófagos aislados incubados con partículas (**Fig. 36**).

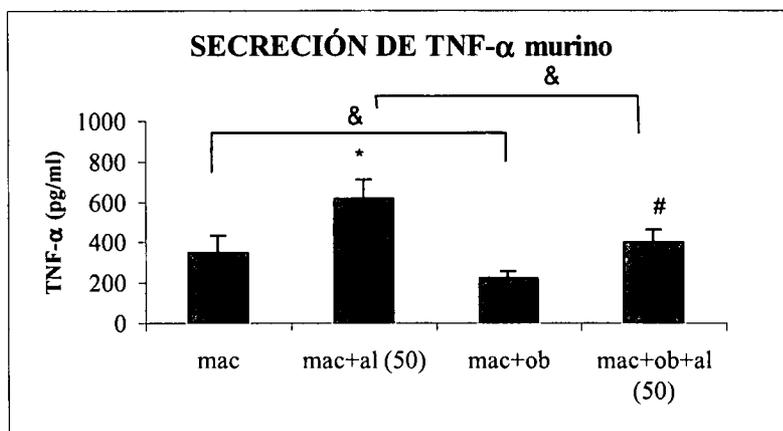


Fig. 36. Efecto de las partículas de alúmina sobre macrófagos J774 aislados y en cocultivo con OB humanos en la secreción de TNF- α . La secreción de TNF- α por los macrófagos fue determinada en el medio celular condicionado de los macrófagos aislados (mac) y en cocultivo con OB (mac+ob) no tratados, así como tras el tratamiento con 50 mg/pocillo de partículas de alúmina en ambos grupos, mac+al (50) y mac+ob+al (50), durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media \pm ES (n = 6).

*p<0.05, respecto a mac.

#p<0.05, respecto a mac+ob.

&p<0.05, respecto a mac y mac+al (50).

➤ Secreción de IL-6 murina

La exposición de los macrófagos a partículas de alúmina no afectó la liberación de IL-6 (Fig. 37).

Los macrófagos en cocultivo con OB en ausencia de partículas liberaron más IL-6 que los macrófagos no expuestos (Fig. 37). La incubación de macrófagos y OB en el cocultivo con partículas, produjo igualmente un aumento en los niveles de IL-6 comparados con los de las células en el cocultivo y con los macrófagos tratados o no tratados con partículas de alúmina (Fig. 37).

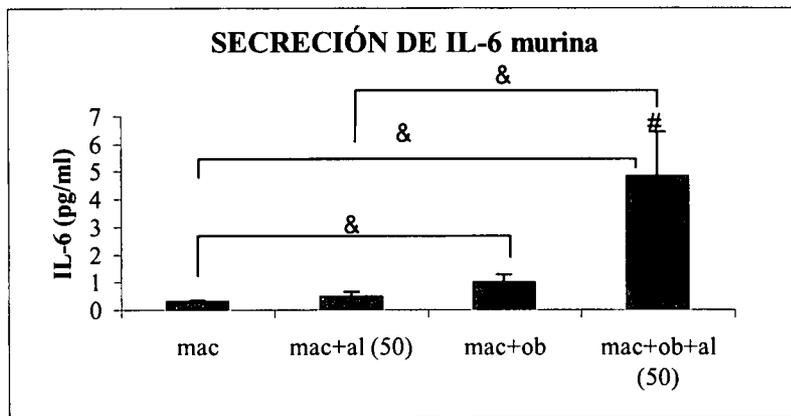


Fig. 37. Efecto de las partículas de alúmina sobre macrófagos J774 aislados y en cocultivo con OB humanos en la secreción de IL-6. La secreción de IL-6 por los macrófagos fue determinada en el medio celular condicionado de los macrófagos aislados (mac) y en cocultivo con OB (mac+ob) no tratados, así como tras el tratamiento con 50 mg/pocillo de partículas de alúmina en ambos grupos, mac+al (50) y ob+mac+al (50), durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media \pm ES (n = 6).

#p<0.05, respecto a mac+ob.

&p<0.05, respecto a mac y mac+al (50).

b) Liberación de mediadores por los OB

➤ Secreción de GM-CSF

La liberación de GM-CSF aumentó en OB expuestos a 50 mg/pocillo de partículas de alúmina (**Fig. 38**).

Los OB en cocultivo con macrófagos no tratados con partículas liberaron más GM-CSF que los OB aislados (**Fig. 38**). La adición de partículas de alúmina al sistema de cocultivo indujo una mayor secreción de GM-CSF por los OB que la producida en el resto de los grupos (**Fig. 38**).

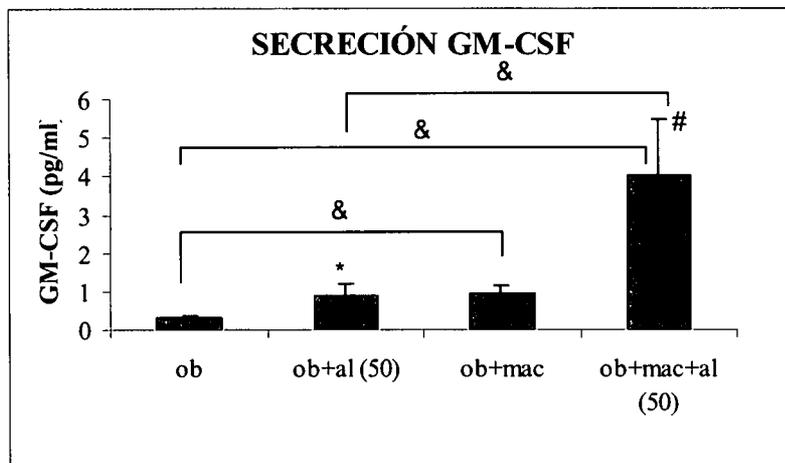


Fig. 38. Efecto de las partículas de alúmina sobre OB humanos aislados y en cocultivo con macrófagos J774 en la secreción de GM-CSF. La secreción de GM-CSF por los OB fue determinada en el medio celular condicionado de los OB aislados (ob) y en cocultivo con macrófagos (ob+mac) no tratados, así como tras el tratamiento con 50 mg/pocillo de partículas de alúmina en ambos grupos, ob+al (50) y ob+mac+al (50), durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media \pm ES (n = 6).

*p<0.05, respecto a ob.

#p<0.05, respecto a ob+mac.

&p<0.05, respecto a ob y ob+al(50).

➤ *Secreción de IL-6 humana*

Los niveles de IL-6 en los medios celulares condicionados de OB incubados con partículas de alúmina, aumentaron con respecto a los OB aislados (Fig. 39).

En el cocultivo OB-macrófago la secreción de IL-6 fue más elevada que en los OB tratados o no tratados con partículas de alúmina (Fig. 39). La incubación del sistema de cocultivo con alúmina indujo en los OB un incremento en la secreción de IL-6, que fue mayor comparada con el resto de los grupos (Fig. 39).

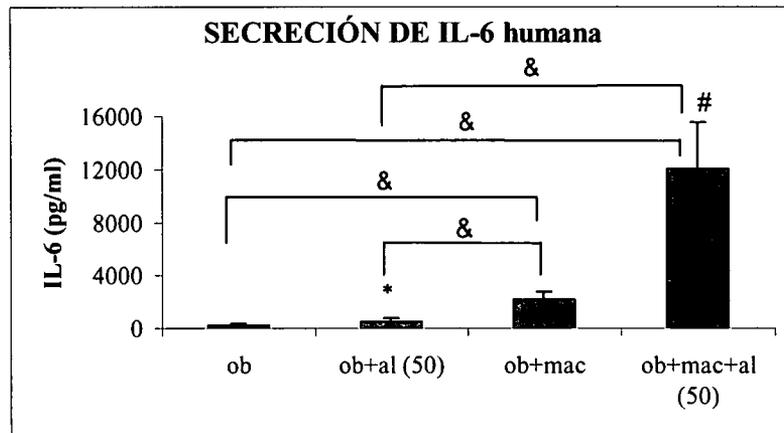


Fig. 39. Efecto de las partículas de alúmina sobre OB humanos aislados y en cocultivo con macrófagos J774 en la secreción de IL-6. La secreción de IL-6 por los OB fue determinada en el medio celular condicionado de los OB aislados (ob) y en cocultivo con macrófagos (ob+mac) no tratados, así como tras el tratamiento con 50 mg/pocillo de partículas de alúmina en ambos grupos, ob+al (50) y ob+mac+al (50), durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media \pm ES (n = 6).

*p<0.05, respecto a ob.

#p<0.05, respecto a ob+mac.

&p<0.05, respecto a ob y ob+al (50).

- Expresión de IL-6 en el cocultivo de OB y macrófagos tratados o no tratados con 50 mg/pocillo de partículas de alúmina

Se realizaron curvas de titulación de cantidades de ARNm pertenecientes a OB procedentes de tres cultivos primarios tratados o no tratados con partículas de alúmina (apartado 8). Se observó que la cantidad de 50 ng de ARN total no producía saturación de la señal, siendo por tanto adecuada para realizar la RT-PCR (**Fig. 28**). Sin embargo, en el sistema de cocultivo OB-macrófago, las curvas de titulación realizadas utilizando ARN total procedente de tres cultivos primarios de OB, mostraron que con 50 ng de ARN se produce saturación de la señal y que la cantidad óptima en este sistema de cocultivo, tanto en ausencia como en presencia de partículas era 0,5 ng de ARN (**Fig. 40**). Esta circunstancia indica, de partida, que los OB y macrófagos en cocultivo expresan más IL-6 que los OB aislados.

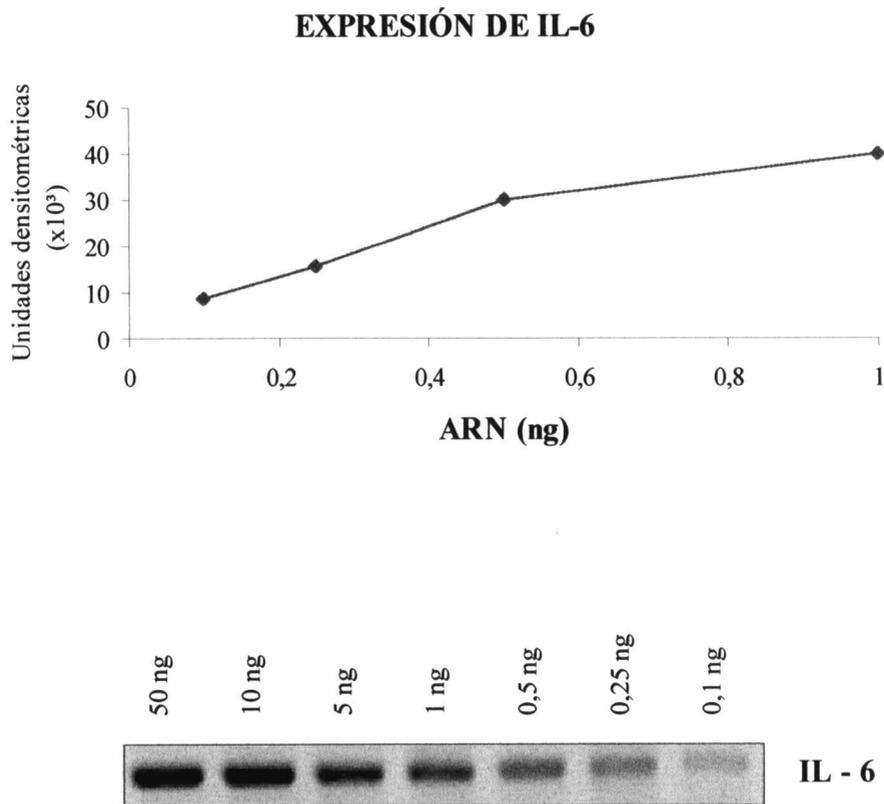


Fig. 40. Titulación de la expresión del gen de la IL-6 en OB humanos en cocultivo con macrófagos J774. La expresión del gen de la IL-6 fue determinada mediante RT-PCR semicuantitativa de células osteoblásticas humanas en cocultivo con macrófagos tratadas con 50 mg/pocillo de partículas de alúmina, durante 24 horas en medio libre de suero. Gel representativo correspondiente al ARNm de la IL-6 de un cultivo. (n= 3).

Tal y como se observó en el apartado 8 las partículas de alúmina inducen un incremento en la expresión de IL-6 en células osteoblásticas humanas en cultivo primario (**Fig. 41 A**). En el cocultivo de OB y macrófagos se produjo un gran incremento en la expresión de IL-6 con respecto a los OB aislados, tanto tratados como no tratados con partículas (**Fig. 41 B**). Además la adición de partículas de alúmina al cocultivo incrementó aún más la expresión de IL-6, obteniéndose valores más altos que en el resto de las situaciones [**Fig. 41 (A, B)**].

EXPRESIÓN DE IL-6

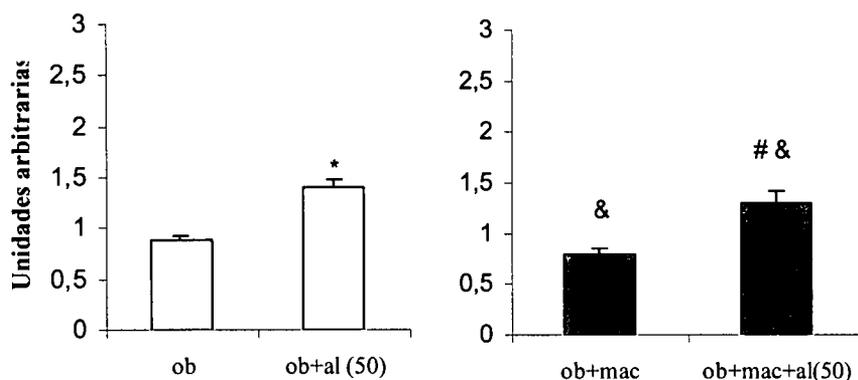


Fig. 41. Efecto de las partículas de alúmina sobre OB humanos aislados y en cocultivo con macrófagos J774 en la expresión de IL-6. La expresión de IL-6 por los OB fue determinada mediante RT-PCR semicuantitativa de los OB aislados (ob) y en cocultivo con macrófagos (ob+mac) no tratados, así como tras el tratamiento con 50 mg/pocillo de partículas de alúmina en ambos grupos, ob+al (50) y ob+mac+al (50), durante 24 horas en medio libre de suero. Los resultados se expresan como la media \pm ES (n = 6), y están corregidos por los valores correspondientes de GAPDH.

* $p < 0.05$, respecto a ob.

$p < 0.05$, respecto a ob+mac.

& $p < 0.05$, respecto a ob y ob+al(50). Nota¹

Nota¹: Se ha tenido en consideración que la cantidad de ARN total utilizada para amplificar el gen de la IL-6 en el cocultivo era de 0,5 ng, mientras que en los OB aislados la cantidad utilizada fue de 50 ng (100 veces mayor), ya que no se hayó una cantidad de ARN total común para ambas situaciones que proporcionara una amplificación submáxima.

- Efecto del TNF- α murino exógeno en la secreción de IL-6 humana

El tratamiento con TNF- α murino exógeno no modificó la secreción de IL-6 en OB humanos en cultivo primario. Sin embargo, la secreción de IL-6 aumentó en estos cultivos al tratarlos con partículas de alúmina (**Fig. 42**).

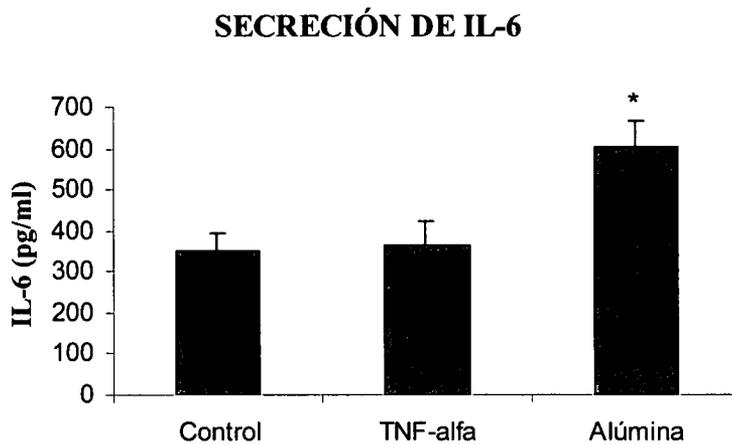


Fig. 42. Efecto del TNF- α murino exógeno en la secreción de IL-6 humana. La secreción de IL-6 fue determinada en el medio celular condicionado de tres cultivos primarios de OB humanos no tratados (Control) y tratados con 300 pg/mL TNF- α o con 50 mg/pocillo de partículas de alúmina, durante 24 horas en medio libre de suero.

* $p < 0.05$, respecto al Control.

Discusión

DISCUSIÓN

1. CULTIVO PRIMARIO DE OB HUMANOS

1.1. Dificultades para su realización

Los cultivos de OB humanos son útiles para evaluar la biocompatibilidad de los biomateriales tanto en forma de partícula como de bloque [163,185]. Para tal fin se han utilizado células osteoblásticas humanas, de ratón, de rata, o células transformadas (líneas celulares de osteosarcoma, como MG-63, SaOS-2, HOS, MC3T3...).

En el presente estudio utilizamos cultivos primarios de células osteoblásticas humanas procedentes de hueso trabecular, para cuya realización se han debido superar una serie de obstáculos. Primero, el crecimiento de nuestros cultivos era muy lento con las consiguientes dificultades técnicas para la supervivencia de las células en cultivo y para la obtención del material celular suficiente para realizar los experimentos. Segundo, la superficie ósea trabecular está en contacto con la médula ósea con la posibilidad de contaminación con células de dicha médula, especialmente fibroblastos. Por último, las células en cultivo primario eran utilizadas en los primeros pases debido a la pérdida de las características osteoblásticas con los pases sucesivos.

1.2. Caracterización de los cultivos de OB humanos

El fenotipo osteoblástico se caracteriza por la síntesis de colágeno tipo I, el incremento de la fosfatasa alcalina [182] y de la osteocalcina en respuesta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [186,187] y por la producción de AMPc tras la estimulación con PTH [188].

Nuestros resultados muestran que los cultivos primarios de OB humanos utilizados poseen fenotipo osteoblástico. Sintetizan PICP y sólo el 10 % del colágeno total es PIIINP, característico de fibroblastos. Responden a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ incrementando la secreción de osteocalcina. Además, los resultados de la citoquímica muestran que al tratar las células con dos agentes diferenciadores, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y el $\text{TGF-}\beta_1$, más del 70

% de las células son positivas para la fosfatasa alcalina. Resultados similares fueron obtenidos por Wergedal y col. [182] en muestras de OB humanos.

2. INFLUENCIA DE LAS PARTÍCULAS DE POLIETILENO, MA 956 Y ALÚMINA SOBRE DIVERSOS MARCADORES DEL FENOTIPO OSTEABLÁSTICO. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA.

Los resultados del presente estudio indican que las células osteoblásticas humanas en cultivo primario responden directamente a las partículas de polietileno, de la aleación MA 956 y de alúmina y esta respuesta es dependiente de la composición y del tamaño de las mismas.

La reacción del tejido óseo a las partículas de biomaterial es compleja y el mecanismo que se desencadena no está completamente aclarado, pero se ha sugerido que la resorción ósea por los OC está incrementada [42] y la formación ósea por los OB disminuída [170]. Aunque el mayor impacto de las partículas se refleja en la resorción, Kadoya y col. [134] advierten que las partículas también afectan a la formación ósea. Además, Goodman y col. [170] mostraron que las partículas de polietileno y las de Co-Cr disminuían la formación neta de hueso en un modelo *in vivo* en conejos. Numerosos estudios *in vitro*, [133,157-167], sugieren que el estudio de las modificaciones de la función osteoblástica en presencia de las partículas de varios biomateriales protésicos y en OB de diversos orígenes no es desdeñable, ya que puede proporcionar información básica a la hora de comprender el fenómeno osteolítico.

Sin embargo, hasta el momento no había sido estudiado el efecto de las partículas de polietileno y de alúmina, ni la influencia del tamaño de las mismas, en el fenotipo de células osteoblásticas en cultivo primario.

El polietileno ha sido considerado uno de los principales causantes del fracaso protésico asociado al aflojamiento aséptico [39-42,131,132], y las cerámicas son consideradas casi inertes, pero se sabe muy poco de su efecto en la respuesta de macrófagos y OB. Estudios previos, evaluando membranas periprotésicas retiradas en el momento de la revisión de prótesis de cadera, revelaron que el par cerámica-cerámica generaba menos partículas y una reacción inflamatoria menos intensa que el par metal-polietileno [189]. Estudios *in vivo* han demostrado que la reacción del tejido es más

severa frente a partículas de polietileno y Co-Cr que frente a partículas de alúmina [171]. Otros trabajos han estudiado los cambios morfológicos y de actividad osteoblástica sobre superficies de alúmina y han demostrado un alto grado de citocompatibilidad [190,191]. Por otra parte, el efecto de las partículas de alúmina sobre la estimulación de linfocitos o macrófagos es menor comparado con otras partículas como titanio, acero inoxidable o polietileno [183,192]. Se ha comprobado también que las partículas de alúmina inhiben el crecimiento fibroblástico, pero esta inhibición es menor que la producida por las partículas de acero inoxidable [193]. Además se ha demostrado que las partículas de alúmina son capaces de inducir apoptosis en igual medida que las de polietileno en macrófagos [194].

El estudio de las posibles alteraciones en la proliferación celular como respuesta a la presencia de biomateriales, bien en forma de bloque o de partícula, permite la evaluación de la citocompatibilidad basal, relacionada con funciones celulares comunes.

Nuestros resultados, utilizando contaje celular, muestran que las partículas de polietileno de los dos tamaños estudiados, $< 80 \mu\text{m}$ y $< 160 \mu\text{m}$, inhiben el crecimiento celular osteoblástico y las partículas de menor tamaño son las que producen un efecto mayor. Sin embargo, en el caso de las partículas de alúmina, sólo las de tamaño $< 80 \mu\text{m}$ inhibieron el crecimiento celular. Este efecto se produjo en menor grado que el producido por las partículas de polietileno del mismo tamaño.

La disminución en la proliferación observada en este trabajo ha sido también descrita por otros autores utilizando distintos biomateriales y células osteoblásticas de distintos orígenes [158,161,163]. Zambonin y col. [158], exponiendo células osteoblásticas humanas procedentes de hueso trabecular a partículas de PMMA observaron un descenso en el crecimiento celular. Partículas cerámicas como las de hidroxiapatita y fosfato tricálcico, causaron un efecto inhibitorio similar en OB procedentes de calvaria de rata [163]. Los mismos autores, en un estudio posterior, mostraron que las partículas de hidroxiapatita inducían una disminución significativa en la población osteoblástica [161], siendo las partículas más pequeñas las que producían un mayor descenso en la proliferación celular. Por otra parte, también apoyando nuestros resultados, Anderson y col. [195] han observado una inhibición en el crecimiento de OB humanos en cultivo primario al ser incubados con fluido sinovial de pacientes con implantes aflojados de cadera.

Sin embargo, en contraste con nuestras observaciones, otros autores no han encontrado cambios en la proliferación celular al investigar la biocompatibilidad *in vitro* de determinados materiales y otros incluso han observado incrementos en dicha proliferación celular [133,160,162,164]. Yao y col. [160] no encontraron variaciones en la población celular después del tratamiento de las células osteoblásticas humanas MG63 con partículas de Ti. Por el contrario, un trabajo reciente [162] utilizando las células MG63, indica que las partículas de Ti, TiAlV y Co-Cr inducen un incremento en el número de células y, además este efecto es dependiente de la composición. Dean y col. han observado los mismos efectos al exponer las mismas células a partículas de polietileno, bien comercial [164] o retirado del tejido membranoso de prótesis aflojadas [133]. Estos incrementos en la proliferación celular después de someter a las células a tratamiento con partículas de polietileno discrepan con nuestros resultados, ya que nuestros experimentos muestran descensos en la población celular como consecuencia de la exposición de las células a dichas partículas. Estas diferencias podrían deberse a que estos autores utilizan una línea celular, que por ser células transformadas, podrían tener respuestas alteradas. En nuestro estudio utilizamos OB humanos en cultivo primario, células no transformadas, en los que cualquier respuesta observada puede ser atribuida al fenotipo de estas células. Asimismo, las diferencias observadas también podrían deberse al distinto tamaño de las partículas ensayadas en ambos trabajos.

Otros investigadores han estudiado la proliferación de las células osteoblásticas sobre las superficies de los biomateriales encontrándose distintos efectos [26,191,196]. En concordancia con nuestros resultados Hott y col. [26] han demostrado descensos en la proliferación celular al estudiar el comportamiento de las células osteoblásticas humanas procedentes de hueso trabecular sobre hidroxiapatita.

Por el contrario, los vidrios bioactivos son capaces de estimular la población celular osteoblástica humana procedente de hueso trabecular, no así otras superficies como Ti o poliestireno [196]. Otros autores han encontrado aumentos en la proliferación de OB alveolares sobre superficies de alúmina, contrariamente a lo que sucede sobre superficies de Ti [191].

Dado que la formación ósea depende en gran parte del número de OB [197] y que el número de OB es dependiente, naturalmente, de la proliferación celular [198], nuestros resultados sugieren una posible disminución de la formación de hueso en presencia de

partículas de polietileno, y en menor grado, en presencia de partículas de alúmina. Se advierte igualmente una mayor biocompatibilidad de la alúmina frente al polietileno, ya que la primera es mejor tolerada por los OB en términos de proliferación celular.

Evalúamos también la citocompatibilidad específica, que se relaciona con funciones características del fenotipo celular osteoblástico: producción de PICP, fosfatasa alcalina y osteocalcina.

En este trabajo se demuestra que la secreción de PICP disminuye en presencia de los tres biomateriales estudiados. El PICP es uno de los dos propéptidos terminales (N-terminal y C-terminal) presentes en ambos extremos de la molécula de procolágeno sintetizada durante el paso intracelular de la producción de colágeno tipo I por los OB. El siguiente paso extracelular convierte el procolágeno en colágeno, después de liberar los propéptidos terminales. El PICP es pues un índice válido de la capacidad del OB para construir matriz ósea [178]. Los niveles de PICP disminuyen en el medio condicionado cuando las células son expuestas a las partículas de polietileno más pequeñas, $< 30 \mu\text{m}$, de forma independiente de la presencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Las partículas de MA 956 y de alúmina también disminuyeron la secreción de PICP, en ausencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, y las partículas de la aleación más pequeñas, $< 10 \mu\text{m}$, produjeron un efecto más acusado.

Las hormonas calciotrópicas como el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ desempeñan un importante papel en la función osteoblástica. Los datos sobre el efecto del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la secreción de PICP por las células osteoblásticas son contradictorios. Mientras que algunos autores muestran una disminución [199], otros no han detectado cambios [200] e incluso otros han encontrado aumentos en la secreción del PICP tras la adición de esta hormona [201]. Los niveles de PICP en los cultivos control pertenecientes a la serie del polietileno y a la serie de la alúmina disminuyen después de la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Es probable que los resultados de los cultivos control en la serie del MA 956 difieran de los obtenidos en la serie del polietileno y de la alúmina porque los experimentos se desarrollaron en cultivos primarios procedentes de diferentes pacientes y no en líneas celulares estandarizadas.

Los resultados del presente trabajo están de acuerdo con los de otros autores que muestran que las partículas de distinto tamaño y composición inhiben la producción de colágeno en células osteoblásticas humanas [158,159,164,165]. Allen y col. [159] han

demostrado un efecto inhibitorio de las partículas de Co sobre la producción de colágeno tipo I en dos líneas celulares de OB humanos (MG63 y SaOS-2). Partículas de PMMA inhibieron la síntesis de colágeno en células osteoblásticas humanas en cultivo primario [158]. Dean y col. [133,164] describieron una disminución en la producción de PICP al exponer las células MG63 a partículas de polietileno. Además, partículas de Ti de tamaño no fagocitable disminuyen la expresión del gen del colágeno en células MG63 y en OB humanos en cultivo primario, lo cual sugiere que la señalización celular puede tener lugar independientemente del proceso de fagocitosis [165].

En cuanto al estudio de la producción de colágeno sobre las superficies de biomateriales en forma de bloque se han obtenido distintos resultados [26,185,202]. Puleo y col. [202] demostraron que la síntesis de colágeno en OB de calvaria de rata era parecida en todos los materiales examinados: acero inoxidable, TiAlV, CoCrMo, PMMA, hidroxiapatita, vidrio borosilicato y poliestireno. Hott y col. [26] demostraron un aumento en la producción de colágeno por células osteoblásticas humanas procedentes de hueso trabecular sobre hidroxiapatita. Además, se ha demostrado en células MG-63 que la rugosidad de la superficie, aparte de la composición, puede disminuir la síntesis de colágeno. Dicha síntesis es menor en superficies lisas que en rugosas y en TiAlV menor que en Ti para una rugosidad dada [185].

La disminución en la producción de PICP observada en el presente estudio de forma dependiente del tamaño de la partícula, podría inducir una disminución en la producción de matriz ósea que contribuiría a una formación reducida de hueso.

Los niveles de fosfatasa alcalina no cambiaron después del tratamiento con polietileno, ni tras la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Por el contrario, un estudio previo [157] evidenció un aumento significativo de la actividad de la fosfatasa alcalina después del tratamiento con polietileno y de la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Casi todos los autores coinciden en que la fosfatasa alcalina se incrementa con el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [201,203]. Sin embargo, nuestros resultados son consistentes con otras publicaciones [204,205] que muestran que los cambios en los niveles de fosfatasa alcalina después del tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ están relacionados con los niveles basales de actividad de la enzima. Así, los niveles basales de fosfatasa alcalina del estudio previo [157] eran menores a los encontrados en este trabajo, debido probablemente a diferencias en los estadios de maduración de los OB humanos.

En cuanto a las partículas de MA 956 y de alúmina, sólo las de alúmina $< 10 \mu\text{m}$ indujeron un descenso en los niveles de fosfatasa alcalina, tanto en los cultivos tratados como en los no tratados con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Este descenso en la producción de fosfatasa alcalina podría relacionarse con una disminución de la actividad osteoblástica. Otros autores han encontrado un efecto inhibitorio similar al observado en el presente trabajo con otros biomateriales y tipos celulares osteoblásticos diversos [133,159,162,164]. Así, Allen y col. [159] incubando partículas de Cr y de Co con células MG63 y SaOS-2, observaron descensos en este marcador osteoblástico. Las partículas de Ti, TiAlV y Co-Cr también inducen una disminución en la actividad de la fosfatasa alcalina en MG63, dependiendo de la composición química de las partículas [162]. Dean y col. [133,164] al exponer MG63 a partículas de polietileno han mostrado descensos en la actividad de la fosfatasa alcalina, relacionándolos con una menor diferenciación celular.

Otros autores han investigado los cambios en la producción de fosfatasa alcalina por células osteoblásticas sobre varios biomateriales encontrándose distintos efectos [185,191,206]. Vrouwenvelder y col. [206] han demostrado un incremento en la producción de fosfatasa alcalina en OB de rata en contacto con vidrio bioactivo. Sin embargo, otros biomateriales como la hidroxiapatita, la aleación de Ti y el acero inoxidable no modifican esta enzima en dichas células [206]. Se ha demostrado que la alúmina no modifica la actividad de la fosfatasa alcalina en OB alveolares; por el contrario, el Ti, produce un descenso [191]. Por otra parte, la rugosidad de la superficie afecta a la fosfatasa alcalina produciendo un efecto estimulador en MG-63, mostrándose además, una mayor actividad enzimática en Ti que en TiAlV para una rugosidad dada [185].

Los resultados del presente estudio muestran que la secreción de osteocalcina, el último de los marcadores del fenotipo osteoblástico estudiados, incrementó en todos los casos después de la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. En condiciones basales la producción de esta proteína es baja en OB humanos, pero puede aumentar varias veces tras la estimulación con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. En nuestro estudio este incremento fue mayor en las células tratadas con partículas de polietileno $< 30 \mu\text{m}$. Además, los niveles de expresión del ARNm de la osteocalcina también aumentaron cuando las células fueron expuestas a las partículas de polietileno $< 30 \mu\text{m}$, independientemente de la presencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Sin embargo, el incremento en la secreción después de la adición de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fue menor en las células expuestas a partículas de MA 956 $< 10 \mu\text{m}$ que en el grupo control. Se observó la misma tendencia con las partículas de MA 956 $< 80 \mu\text{m}$ y con las de alúmina de ambos tamaños.

Aunque la osteocalcina es la proteína no colágena más abundante en el hueso, su papel en la fisiología ósea no se conoce con exactitud. Recientes estudios realizados por Ducy y col. [207] han demostrado que ratones transgénicos deficientes en osteocalcina tienen un defecto en la formación, dando lugar a un aumento del grosor del hueso cortical sin afectar a la resorción ósea ni a la mineralización. Este estudio sugiere que la osteocalcina funciona como un inhibidor fisiológico de la formación ósea. Sin embargo, otros estudios muestran que la osteocalcina actúa como un quimioattractante para los progenitores de los OC hacia las superficies óseas, estimulando la resorción [208,209]. De hecho, la resorción de fragmentos óseos deficientes en osteocalcina es aproximadamente la mitad de la de fragmentos con un contenido normal de osteocalcina [208]. Estos datos sugieren que la osteocalcina podría actuar como una señal para la resorción. Por tanto, el incremento en la secreción y expresión de osteocalcina observada en el presente trabajo después de la adición de partículas de polietileno podría estar implicada en el proceso osteolítico, tal y como ya ha sido propuesto en un trabajo previo [157].

En este sentido, se ha demostrado que las partículas de PMMA incrementan la secreción de osteocalcina en las células osteoblásticas [158]. Sin embargo, Dean y col. [164] observaron en MG-63 que las partículas comerciales de polietileno no afectaban a la secreción de osteocalcina, mientras que las retiradas del tejido membranoso de prótesis aflojadas inducían un descenso en dicha secreción [133]. Ésto contrasta con los efectos observados en este trabajo en relación a las partículas de polietileno, pero estas diferencias pueden ser debidas al tipo de células utilizadas o al tamaño de las partículas.

Los resultados obtenidos en la secreción de osteocalcina con las partículas de MA 956 y de alúmina difieren de los obtenidos para el polietileno. El menor incremento en la secreción de osteocalcina en los cultivos incubados con partículas de MA 956 $< 10 \mu\text{m}$ y tratados con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, con respecto a los controles, sugiere una disminución de la actividad osteoblástica, al igual que ocurría con los otros marcadores del fenotipo osteoblástico estudiados, en presencia de partículas de MA 956 o de

alúmina. Efectos similares han sido observados por Allen y col. [159], quienes utilizando partículas de Co-Cr, Cr y Co encontraron una inhibición en la secreción de osteocalcina compatible con una disminución de la actividad osteoblástica.

Al exponer las células osteoblásticas a la superficie del biomaterial, diversos trabajos han demostrado aumentos en la secreción de osteocalcina [185] o niveles invariables [190]. Se ha descrito [185] un aumento en la secreción de osteocalcina por células MG63 sobre Ti rugoso, no así en TiAlV de igual rugosidad o sobre superficies de las mismas composiciones pero lisas. Tampoco se han observado cambios en la secreción de osteocalcina por células osteoblásticas humanas procedentes de hueso trabecular al crecer sobre superficies de alúmina [190].

En este trabajo se ha demostrado que las partículas de polietileno, las metálicas de la aleación MA 956 y las de alúmina, dependiendo del tamaño y de la composición de las mismas, afectan directamente al fenotipo de los OB humanos en cultivo primario.

Las partículas de polietileno producen un aumento en la diferenciación celular al disminuir la proliferación y la secreción de PICP y al aumentar la secreción y expresión de osteocalcina, relacionada con la mineralización y la quimiotaxis de precursores osteoclasticos. Además, la activación de la resorción y la inhibición de la proliferación y la síntesis de colágeno están influenciadas por el tamaño de partícula, siendo las partículas más pequeñas las que afectan en mayor medida a la función osteoblástica. Estas partículas pequeñas han sido consideradas en múltiples trabajos como las causantes de la osteolisis periprotésica a través de la activación de los macrófagos [137-148]. Además, Horowitz demostró que uno de los mecanismos por los cuales la exposición de partículas a macrófagos conduce a la liberación de mediadores y al reclutamiento de OC es dependiente de la presencia de OB [147]. Así pues, algunos de los efectos sobre las células óseas pueden ser indirectos, involucrando la producción de mediadores inflamatorios por monocitos y macrófagos. Sin embargo, nuestros resultados indican que la liberación de osteocalcina por las células osteoblásticas en presencia de partículas de polietileno podría ser otra vía directa que involucraría al OB en el fenómeno osteolítico.

Por otra parte, hemos observado que las partículas de MA 956 y de alúmina pueden inhibir la actividad osteoblástica y que las más pequeñas producen una mayor

modificación de los parámetros estudiados. Sin embargo, los efectos de estas partículas parecen ser menos nocivos que los expuestos para el polietileno.

En resumen, la influencia de las partículas de polietileno y de otros biomateriales como el PMMA [158] parece tener dos vías: a) la disminución de la proliferación y de la síntesis de colágeno, coincidiendo con el efecto observado para las partículas de MA 956 y de alúmina, que podría inducir una inhibición en la formación ósea; b) un incremento de la osteocalcina, que podría activar el proceso de resorción ósea. Ambos efectos podrían causar un desequilibrio en el remodelado óseo y contribuir a la pérdida de hueso y osteolisis progresiva.

Sin embargo, el MA 956 y la alúmina no aumentan los niveles de osteocalcina, por lo cual este mecanismo no estaría involucrado en la resorción ósea mediada por la acción quimiotáctica de la osteocalcina.

Podemos concluir en este estudio que el nuevo biomaterial parece tener menos efectos adversos sobre el fenotipo osteoblástico que otros biomateriales.

3. INFLUENCIA DE LAS PARTÍCULAS DE POLIETILENO Y DE ALÚMINA SOBRE LA SÍNTESIS DE IL-6 EN OB HUMANOS

En nuestro estudio observamos que las partículas de polietileno y de alúmina son capaces de estimular la producción de IL-6 en OB humanos en cultivo primario, siendo dicho efecto dependiente de la composición y la concentración de las partículas.

La IL-6 es una citoquina multifuncional que es sintetizada por distintos tipos de células [210-214]. En el microambiente óseo la IL-6 es producida por monocitos, células estromales derivadas de la médula ósea, OC y OB. La producción de IL-6 por las células osteoblásticas es estimulada por varios agentes incluyendo la PTH, la proteína relacionada con la PTH (PTHrP) y citoquinas como la IL-1 y el TNF- α , lo cual implica a la IL-6 como mediador local de resorción ósea [211,212,214-216].

Se ha demostrado que la IL-6 es un potente estimulador de la diferenciación osteoclástica a partir de los progenitores hematopoyéticos [217]. Además la IL-6 produce resorción ósea en modelos *in vivo* e *in vitro* que contienen precursores de los OC [212,214]. Por último, enfermedades asociadas con pérdida de hueso como la

enfermedad de Paget, cursan con niveles elevados de esta citoquina, lo que la implica definitivamente en el remodelado óseo [218].

Se ha implicado a la IL-6 liberada por los OB en la reacción osteolítica, al observarse que tras la fagocitosis por los macrófagos de las partículas de PMMA se induce la producción de TNF- α , el cual estimula a los OB a producir PGE₂, GM-CSF e IL-6 [147]. La liberación de estos factores podría resultar en el reclutamiento de OC y macrófagos y en un aumento de la resorción ósea [129,219]. En este proceso el OB desempeñaría un papel secundario frente a la respuesta directa de los macrófagos a las partículas.

Diversos autores han mostrado aumentos en la liberación de citoquinas implicadas en resorción ósea, entre ellas la PGE₂, en presencia de partículas de biomateriales distintos y células osteoblásticas de varios orígenes [161,164]. Dean y col. [164] encontraron un aumento en la liberación de PGE₂ al exponer las células osteoblásticas de la línea MG63 a partículas de polietileno.

Zambonin y col. [158] describieron un aumento en la secreción de IL-6 por células osteoblásticas humanas en cultivo primario en presencia de partículas de PMMA. Recientemente se ha demostrado que las células osteoblásticas humanas MG63 responden a las partículas de Ti incrementando la expresión y secreción de la IL-6 [166]. Otro trabajo reciente muestra que la producción de IL-6 en dos líneas celulares osteoblásticas humanas (MG63 y SaOS-2) es estimulada de forma aditiva por la combinación de TNF- α y partículas de Ti [167]. El aumento observado en la producción de IL-6 en nuestro estudio fue un efecto directo de las partículas de polietileno y de alúmina en las células osteoblásticas. Así pues, en el tejido periprotésico las partículas podrían interaccionar con los OB produciendo factores locales, entre ellos la IL-6, que podrían estimular la resorción de hueso conduciendo a la osteolisis y al aflojamiento aséptico.

En el presente trabajo se observó que a una concentración de 10 mg/pocillo de partículas, tanto de polietileno como de alúmina, se estimuló la expresión y la secreción del gen de la IL-6 en los OB humanos. Las dosis que produjeron la secreción máxima y estable de IL-6 fueron 10 mg/pocillo en el caso de las partículas de alúmina, y 50 mg/pocillo en el caso del polietileno. Por esta razón elegimos estas dos dosis, 10 y 50

mg/pocillo, para comparar los efectos de las partículas de polietileno y de alúmina sobre la liberación de dicha citoquina.

Con la concentración de 10 mg/pocillo, la cual produjo la máxima secreción en los cultivos tratados con partículas de alúmina, los niveles de IL-6 en el medio condicionado fueron más altos que los inducidos con la misma dosis de partículas de polietileno. Sin embargo, al aumentar la dosis hasta 50 mg/pocillo, el efecto estimulador de las partículas de polietileno continuó aumentando y los niveles alcanzados, tanto de ARNm de IL-6 como de proteína secretada, fueron más altos que los alcanzados en los cultivos tratados con la misma concentración de partículas de alúmina. Así pues, a dosis altas las partículas de alúmina mostraron menor capacidad que las de polietileno para estimular la producción de IL-6 por OB humanos en cultivo primario.

Ha sido descrito que la liberación de citoquinas por los OB en respuesta a los biomateriales depende de la composición de las partículas. Lohmann y col. [162] demostraron una mayor secreción de PGE₂ después de la exposición a partículas de Co-Cr que frente a Ti o a TiAlV. Se ha demostrado *in vivo* que la reacción del tejido es más severa frente a partículas de polietileno o Co-Cr, que frente a partículas de alúmina [171]. Por otra parte, la tasa de desgaste *in vivo* del par cerámica-cerámica es 4000 veces menor que la del par metal-polietileno [53]. Así pues, los volúmenes de partículas de alúmina generados *in vivo* podrían no ser suficientes para iniciar una respuesta inflamatoria que resultara en la osteolisis periprotésica y en el aflojamiento aséptico del implante. En nuestro estudio encontramos que una baja concentración de partículas de alúmina indujo el mayor incremento en la secreción de IL-6 en el OB. Sin embargo, la característica más común observada en el tejido interfacial de las prótesis aflojadas es la abundancia de partículas de polietileno, generadas en un número mucho más elevado que las de alúmina en la articulación artificial [39-42,131,132]. Así, Kobayashi y col. [40] concluyeron que el factor crítico en la patogénesis de la osteolisis periprotésica era la gran concentración de partículas de polietileno encontradas en el tejido. Dicha acumulación de partículas de polietileno podría estimular la producción de IL-6 a más altos niveles que las partículas de alúmina, producidas en menor número. Éste podría ser uno de los factores que expliquen la menor osteolisis desarrollada en prótesis cerámica-cerámica comparada con las prótesis convencionales de polietileno-metal [35].

Trabajos recientes han estudiado el efecto de las partículas de polietileno y de alúmina sobre la liberación de citoquinas en otras células no osteoblásticas. Ha sido demostrado que la liberación de TNF- α por macrófagos de ratón de la línea J774 era mayor con partículas de polietileno que con partículas de alúmina del mismo tamaño [183].

Otro estudio reciente ha mostrado que los niveles más altos en la liberación de citoquinas como TNF- α , IL-1 y IL-8 en monocitos humanos de la línea THP-1, se alcanzan tras el tratamiento con partículas de polietileno, mientras que las de Ti produjeron niveles más bajos [220].

En el apartado anterior de esta discusión hemos considerado los efectos de las partículas de polietileno y de alúmina sobre la proliferación celular y varios marcadores del fenotipo osteoblástico, observándose cambios dependientes de la composición del biomaterial y del tamaño de las partículas sometidas a estudio. Hemos visto que las partículas de polietileno disminuyeron la proliferación y aumentaron la producción de osteocalcina, lo cual podría influenciar la formación y la resorción ósea. Sin embargo, las partículas de alúmina afectaron en menor medida a la función osteoblástica.

Estos hallazgos, unidos al poder estimulador mayor del polietileno frente a la alúmina sobre la síntesis de IL-6, sugiere que la alúmina es más biocompatible que el polietileno.

4. EFECTOS DE LAS PARTÍCULAS DE ALÚMINA EN EL COCULTIVO OB-MACRÓFAGO

Al evaluar la biocompatibilidad de un material puede ser de gran importancia examinar su efecto sobre OB y macrófagos, ya que dichas células pueden interactuar en la interfaz [146-149,221-223]. Para simular esta compleja doble interacción en nuestro estudio utilizamos un inserto con los macrófagos de la línea J744 en la superficie, que fue colocado sobre un pocillo que contenía los OB humanos en cultivo primario. En este sistema experimental ambos tipos celulares son expuestos a partículas de alúmina, permitiendo emular la continua interacción que existe *in vivo* entre OB, macrófagos y el biomaterial.

Varios estudios *in vitro* han demostrado que las partículas de desgaste activan a los macrófagos incrementando la secreción y expresión de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF... [137-145,220]. Estos mediadores podrían estimular la resorción localizada de hueso [129,219] y éste podría ser un mecanismo por el cual la activación de los macrófagos inducida por las partículas contribuyera al fracaso de los implantes protésicos.

En el presente estudio la secreción de IL-6 por los macrófagos en presencia de partículas de alúmina no se modificó con respecto a los macrófagos aislados. En varios trabajos han utilizado la misma línea celular y no han sido capaces de detectar dicha citoquina tras la exposición a partículas de polietileno o PMMA [147,148]. Por el contrario, se ha descrito recientemente que las partículas de Ti estimulan la liberación de IL-6 en dichas células [224]. Estas discrepancias podrían deberse al distinto tipo de biomaterial utilizado en cada estudio.

En el sistema de cocultivo OB-macrófono los niveles de IL-6 murina aumentaron respecto a los macrófagos aislados, y la exposición de dicho cocultivo a partículas de alúmina incrementó la secreción de IL-6 respecto a las otras tres condiciones ensayadas. Estos resultados indican que la producción de IL-6 por los macrófagos estaría influenciada por la presencia de OB que producirían mediadores que inducen un incremento en dicha secreción.

La expresión y la secreción de IL-6 en los OB incrementó tras la incubación con partículas de alúmina. La secreción de IL-6 en el cocultivo fue mucho mayor que en los OB aislados en ausencia o presencia de alúmina. Las células en cocultivo expuestas a partículas liberaron más IL-6 que en el resto de los grupos y se observó un efecto dependiente de la concentración. Se obtuvieron patrones similares en la expresión del gen de la IL-6. Estos resultados sugieren que la exposición de los macrófagos a las partículas de alúmina podría producir mediadores que estimularían a los OB a liberar IL-6. Diversos estudios han mostrado una interacción similar entre macrófagos y OB con otros biomateriales como PMMA, polietileno y Ti [146-149,221-223].

En nuestro estudio observamos que tanto en la IL-6 procedente de macrófagos como de OB, los niveles más altos se producen en el sistema de cocultivo con la adición de las partículas de alúmina. Los niveles de IL-6 producidos por los macrófagos en cualquiera de las condiciones experimentales ensayadas son menores que los obtenidos en el caso

de los OB. La utilización de anticuerpos específicos de especie en nuestro estudio, permite distinguir la contribución de ambos tipos celulares en la liberación de los distintos mediadores. Así, el sistema experimental utilizado permite asignar la mayor contribución en la secreción de IL-6 a la célula osteoblástica.

Este incremento en la IL-6 durante la interacción de macrófagos y OB podría ser importante *in vivo*, ya que los altos niveles de IL-6 podrían contribuir a una acelerada resorción de hueso debido a la estimulación de los OC por esta citoquina [212,214,217].

En cuanto a la secreción de GM-CSF por los OB en presencia de partículas de alúmina se observó un incremento. Los OB en cocultivo con macrófagos secretaron mayores niveles de GM-CSF comparados con los OB aislados. Además, la incubación de OB y macrófagos con partículas produjo un aumento en la liberación de dicha citoquina de forma dependiente de la dosis, con respecto a las células en cocultivo en ausencia de partículas. En concordancia con nuestros resultados un trabajo previo ha demostrado que la incubación del medio celular condicionado de macrófagos de la línea J774 expuestos a partículas de PMMA con OB de la línea MC3T3 condujo a un aumento en la secreción de GM-CSF [147]. Por otra parte, se ha descrito en cocultivo que el tratamiento de los mismos tipos celulares con partículas de PMMA, pero no así con partículas de Ti, conduce a un aumento en los niveles de GM-CSF, que podría estimular el reclutamiento de macrófagos y OC a los sitios de resorción [222].

En nuestro estudio se observó que la exposición de macrófagos a partículas de alúmina estimuló la liberación de TNF- α . Sin embargo, en el cocultivo macrófago-OB la secreción de TNF- α disminuyó respecto a los macrófagos aislados. La adición de partículas al cocultivo produjo un incremento en los niveles de esta citoquina respecto al cocultivo en ausencia de partículas, siendo dichos niveles menores a los obtenidos en los macrófagos en presencia de partículas. Estos resultados indican que el biomaterial es capaz de aumentar directamente la secreción de TNF- α por los macrófagos, pero además los OB son capaces de inducir una disminución en dicha secreción, lo que sugiere que la modulación de la liberación de mediadores puede estar ocurriendo entre ambos tipos de células.

Numerosos estudios han demostrado la estimulación de la secreción de TNF- α en macrófagos de varios orígenes al exponerlos a distintos biomateriales [144,148,183,220]. Horowitz y col. demostraron que el medio celular condicionado por

macrófagos en presencia de partículas de PMMA estimulaba en los OB la secreción de citoquinas como IL-6, GM-CSF y PGE₂ [147]. Estos autores otorgan al TNF- α un papel central en la liberación de estas citoquinas por el OB [225].

El TNF- α estimula la producción de IL-6 en OB humanos [167,226]. Así, la combinación de TNF- α y partículas de Ti tiene efectos aditivos en la producción de IL-6 en células osteoblásticas MG63 y SaOS-2 [167]. En el presente estudio observamos que el TNF- α de ratón, en la máxima concentración obtenida en el sistema de cocultivo, no fue capaz de estimular la secreción de IL-6 por los OB humanos en cultivo primario. Sin embargo, como anteriormente se ha descrito, en el presente estudio se utiliza un sistema heterólogo. Por ello, aunque no se puede descartar una función estimuladora del TNF- α sobre la síntesis de IL-6 *in vivo*, los resultados obtenidos en este estudio apuntan a que podría haber otros factores implicados en la liberación de IL-6 en el sistema OB-macrófago.

Los niveles más altos de las citoquinas ensayadas, excepto para el TNF- α se obtienen cuando las células son cocultivadas en presencia de partículas. Por tanto, esta interacción podría ser más importante con vistas a la inflamación y resorción ósea en el tejido periprotésico que la liberación de citoquinas que ocurre en el macrófago tras la fagocitosis de las partículas o en el OB tras su activación.

Los resultados del presente trabajo muestran que tanto macrófagos como OB pueden responder por separado a las partículas alúmina, liberando mediadores inflamatorios. Sugerimos que ambos tipos celulares secretan factores solubles que modulan en la otra célula la liberación de otros factores. Además, aunque las interacciones entre OB y macrófagos pueden suceder sin la activación de los macrófagos o los OB por las partículas, la presencia de partículas aumenta la liberación de citoquinas.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El polietileno y la alúmina disminuyen la proliferación de los OB humanos. Este efecto es más marcado en el caso de las partículas de polietileno de menor tamaño.

2. El fenotipo osteoblástico se modifica en presencia de partículas de polietileno, MA 956 y alúmina según la composición y el tamaño de las mismas, siendo las más pequeñas las que producen un efecto mayor en los parámetros estudiados.

2.1. La influencia del polietileno en la actividad osteoblástica parece tener dos vías: (1) una disminución de la secreción de procolágeno C-terminal tipo I, lo cual podría inducir una inhibición de la formación de matriz ósea; (2) un incremento en la secreción y expresión de osteocalcina, que podría activar la resorción ósea.

2.2. Las partículas de MA 956 y de alúmina producen una inhibición en la secreción procolágeno C-terminal tipo I. Al contrario que las de polietileno, no inducen tal incremento en los niveles de osteocalcina.

3. La secreción y expresión de IL-6 aumenta en OB humanos expuestos partículas de polietileno y alúmina. El polietileno estimula más la producción de IL-6 que la alúmina.

4. Las partículas de alúmina inducen la secreción de TNF- α en macrófagos, aislados y en cocultivo con OB. Sin embargo, la presencia de OB produce un descenso en dichos niveles. La secreción de IL-6 por macrófagos aumenta en cocultivo con OB y en presencia de alúmina.

5. Las partículas de alúmina inducen la liberación de GM-CSF en OB en cocultivo con macrófagos. La secreción y expresión de IL-6 aumenta en OB expuestos a partículas de alúmina. Los niveles de IL-6 aumentan aún más en el cocultivo y son máximos en presencia de partículas de alúmina.

6. La estimulación de la producción de la IL-6 y del GM-CSF en el OB no parecen estar mediados por el TNF- α producido por el macrófago.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- 1] Williams D. F. ed. (1987). Definitions in biomaterials. Progress in biomedical engineering. Amsterdam Elsevier. 67.
- 2] Williams D. F. (1992). Medical and dental materials. A comprehensive treatment. In Cahn R. W., Haasen P., Kramer E. J., ed. Materials science and technology. Vol 14. VCH, Weinheim. 1-17.
- 3] Goodman S., Aspenberg P. (1993). Effects of mechanical stimulation on the differentiation of hard tissues. *Biomaterials* 14: 563-9.
- 4] Wilson J. Biocompatibility and tissue response to implants. (1997). *Ann. Chem. Int. Ed.* Cahn R. W., Haasen P., Kramer E. J. 93: S15-S16
- 5] Sundgren J. E., Bodo P., Lundstrom I. (1986). Auger electron spectroscopic studies of the interface between human tissue and implants of titanium and stainless steel. *J. Colloid. Interface Sci.* 110: 9-20.
- 6] Hasting G. W. (1993). Biomaterials-Reality or fiction. In Gallinaro P., ed. European Instructional Course Lectures. The British Society of Bone and Joint Surgery. London. 149-55.
- 7] Jasty M. J., Maloney W. J., Bragdon C. R., Haire T., Harris W. H. (1990). Histomorphological studies of the long-term skeletal responses to well fixed cemented femoral components. *J. Bone Joint Surg.* 72 A: 1220-9.
- 8] Weiss C. M. (1986). Tissue integration of dental endosseous implants: description and comparative analysis of the fibro-osseous integration and osseous integration systems. *J. Oral Implant.* 12: 169-214.
- 9] Galante J. O., Lemons J., Spector M., Wilson P. D., Wright T. M. (1991). The biologic effects of implant materials. *J. Orthop. Res.* 9: 760-75.
- 10] Piconi C., Maccauro G. (1999). Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* 20: 1-25.
- 11] Christel P. S. (1992). Biocompatibility of surgical-grade dense polycrystalline alumina. *Clin. Orthop.* 282: 10-7
- 12] Branemark P-I., Hansson B. O., Adell R., Breine U., Lindstrom J., Hallen O., Ohman A. (1977). Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 16: 1-132
- 13] Puleo D. A., Nanci A. (1999). Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 20: 2311-21.
- 14] LeGeros R. Z., Craig R. G. (1993). Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *J. Bone Miner. Res.* 8: Suppl 2: S583-S596.
- 15] Murai K., Takeshita F., Ayukawa Y., Kiyoshima T., Suetsugu T., Tanaka T. (1996). Light and electron microscopic studies of bone-titanium interface in the tibiae of young and mature rats. *J. Biomed. Mater. Res.* 30: 523-33.

- 16] Albrektsson T., Jacobsson M. (1987). Bone-metal interface in osseointegration. *J. Prosthet. Dent.* 57: 597-607.
- 17] Hench L. L. (1991). Bioceramics: From concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 74: 1487-510
- 18] Gross V., Kinne R., Schmitz H. J., Strunt V. (1988). The response of bone to surface active glass/glass-ceramics. *CRC Crit. Rev. Biocompatibility* 4: 2-10.
- 19] Hench L. L., Wilson J. W. (1993). An introduction to bioceramics. World Scientific, Singapore.
- 20] Le Geros R. Z. (1988). Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv. Dent. Res.* 2: 164-80.
- 21] Jarcho M. (1981). Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin. Orthop.* 157: 259-78
- 22] Izquierdo-Barba I., Salinas A. J., Vallet-Regí M. (1999). In vitro calcium phosphate layer formation on sol-gel glasses of the CaO-SiO₂ system. *J. Biomed. Mater. Res.* 47: 243-50.
- 23] Ohtsuki C., Kushitani H., Kokubo T., Kotani S., Yamamuro T. (1991). Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass-ceramic in the body. *J. Biomed. Mater. Res.* 25: 1363-70.
- 24] Loty C., Sautier J. M., Boulekbache H., Kokubo T., Kim H. M., Forest N. (2000). In vitro bone formation on a bone-like apatite layer prepared by a biomimetic process on a bioactive glass-ceramic. *J. Biomed. Mater. Res.* 49: 423-34
- 25] Okumura M., Ohguohi H., Dohi Y., Katuda T., Tamai S., Doerten H. K., Tabata S. (1997). Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* 37: 122-9
- 26] Hott M., Noel B., Bernache-Assolant D., Rey C., Marie P. J. (1997). Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* 37: 508-16.
- 27] Park J. B. (1995). The biomedical engineering handbook. Bronzino J. D. ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 28] Friedman R. J., Black J., Galante J. O., Jacobs J. J., Skinner H. B. (1993). Current concepts in orthopaedic biomaterials and implant fixation. *J. Bone Joint Surg.* 75 A: 1086-109.
- 29] Bardos D. I. (1990). Titanium and titanium alloys. In William D., ed. *Encyclopedia of Medical and Dental Materials*. Pergamon Press. Oxford. 360-5
- 30] Noort R. V. (1987). Titanium: the implant material of today. *J. Mater. Sci.* 22: 3801-11.
- 31] Semlitsch M. (1987). Titanium alloys for hip joint replacements. *Clin. Mater.* 2: 1-13.
- 32] Schmidt M., Weber H., Schon R. (1996). Cobalt chromium molybdenum metal combination for modular hip prostheses. *Clin. Orthop.* 329: 35-47.

- 33] Lacefield W. R. (1993). Hydroxyapatite coating. In Hench L. L., Wilson J. ed. An introduction to bioceramics. Singapore. World Scientific. 223-8
- 34] Cook S. D., Thomas K. A., Key J. F., Jarcho M. (1988). Hydroxyapatite-coated titanium for orthopedic implants. *Clin. Orthop.* 232: 225-43.
- 35] Skinner H. B. (1999). Ceramic bearing surfaces. *Clin. Orthop.* 369: 83-91.
- 36] Mckellop H., Clarke I., Markolf K. (1981). Friction and wear properties of polymer, metal, and ceramic prosthetic joint materials evaluated on a multichannel screening device. *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 619-53
- 37] Bellare A., Schnablegger H., Cohen R. E. (1995). A small-angle X-ray scattering study of ultra-high molecular weight polyethylene. *Macromolecules* 17: 2325-33
- 38] Li S., Burstein A. H. (1994). Current concepts review-ultra high molecular weight polyethylene. *J. Bone Joint Surg.* 76 A: 1080-90
- 39] Kadoya Y., Kobayashi A., Onashi H. (1998). Wear and osteolysis in total hip replacements. *Acta Orthop. Scand.* 278: 1-16.
- 40] Kobayashi A., Freeman M. A., Bondfield W., Kadoya Y., Yamac T. (1997). Number of polyethylene particles and osteolysis in total joint replacements. A quantitative study using a tissue-digestion method. *J. Bone Joint Surg.* 79 B: 844-8.
- 41] Schmalzried T. P., Jasty M., Harris W. H. (1992). Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. Polyethylene wear debris and the concept of the effective joint space. *J. Bone Joint Surg.* 74 A: 849-63.
- 42] Willert H. G., Bertran H., Buchhorn G. H. (1990). Osteolysis in alloarthroplasty of the hip: The role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. *Clin. Orthop.* 258: 95-107.
- 43] Premnath V., Harris W. H., Jasty M., Merrill E. W. (1996). Gamma sterilization of UHMWPE articular implants: an analysis of the oxidation problem. *Biomaterials* 17: 1741-53.
- 44] Kurtz S. M., Muratoglu O. K., Evans M., Edidin A. A. (1999). Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty. *Biomaterials* 20: 1659-88.
- 45] Wroblewski B. M., Siney P. D., Dowson D., Collins S. N. (1996). Prospective clinical and joint simulator studies of a new total hip arthroplasty using alumina ceramic heads and cross-linked polyethylene cups. *J. Bone Joint Surg.* 78 B: 280-5.
- 46] Beveridge C., Sabiston A. (1987). Methods and benefits of crosslinking polyolefins for industrial applications. *Mater. Des.* 8: 263-8.
- 47] Muratoglu O. K., Bragdon C. R., O'Connor D. O., Jasty M., Harris W. H., Gul R., McGarry F. (1999). Unified wear model for highly crosslinked ultra-high molecular weight polyethylenes (UHMWPE). *Biomaterials* 20: 1463-70
- 48] Park J. B., Lakes R. S. (1992). *Biomaterials: An introduction*, 2d ed. New York, Plenum Press.

- 49] Williams D. F. (1989). A model for biocompatibility and its evaluation. *J. Biomed. Eng.* 11: 185-91.
- 50] Kitsugi T., Yamamuro T., Nakamura T., Kotani S., Kokubo T. (1993). Four calcium phosphate ceramics as bone substitutes for non-weight-bearing. *Biomaterials.* 4:216-24.
- 51] Boutin P. (1972). Arthroplastie totale de la hanche par prothèse en alumine frittée: étude expérimentale et premières applications cliniques. *Rev. Chir. Orthop.* 58: 229-46.
- 52] Dorlot J. M. (1992). Long term effects of alumina components in total hip prostheses. *Clin. Orthop.* 282: 47-52
- 53] Dorlot J. M., Christel P., Meunier A. (1989). Wear analysis of retrieved alumina heads and sockets of hip prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* 23: 299-310.
- 54] Aoki H. (1994). Medical applications of hydroxyapatite. Ishiyaku EuroAmerica, Inc Tokyo, St. Louis.
- 55] Capello W. N., D'Antonio J. A., Manley M. T., Feinberg J. R. (1998). Hydroxyapatite in total hip arthroplasty. Clinical results and critical issues. *Clin. Orthop.* 355: 200-11.
- 56] Furlong R. (1993). A new concept of prosthetic fixation. In Geesink R. G. T., Manley M. T., ed. *Hydroxyapatite coatings in orthopaedic surgery.* Raven Press. New York. 25-32
- 57] Verhaar J. (1993). Early clinical results of hydroxyapatite coated total knee replacements. In Geesink R. G. T., Manley M. T., ed. *Hydroxyapatite coatings in orthopaedic surgery.* Raven Press. New York. 297-304.
- 58] de Groot K., Geesink R. G. T., Klein C. P. A. T., Serekian P. (1987). Plasma sprayed coatings of hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* 21: 1375-87.
- 59] Soballe K., Overgaard S. (1996). The present status of hydroxyapatite coatings of prostheses. *J. Bone Joint Surg.* 78 B: 689-91
- 60] Filiaggi M. J., Coombs N. A., Pilliar R. M. (1991). Characterization of the interface in the plasma-sprayed HA coating/Ti-6Al-4V implant system. *J. Biomed. Mater. Res.* 25: 1211-29.
- 61] Collier J. P., Surprenant V. A., Mayor M. B. (1993). Loss of hydroxyapatite coating on retrieved total hip components. *J. Arthroplasty* 8: 389-93.
- 62] Bloebaum R. D., Beeks D., Dorr L. D., Savory C. G., Dupont J. A., Hofmann A. A. (1994). Complications with hydroxyapatite particulate separation in total hip arthroplasty. *Clin. Orthop.* 298: 19-26.
- 63] Cou B. Y., Chang E. (1999). Microstructural characterization of plasma-sprayed hydroxyapatite-10% ZrO₂ composite coating on titanium. *Biomaterials* 20: 1823-32.
- 64] Planell J. P., Gil F. J. (1997). Contribution of metals and alloys to the design and development of biomaterials. *Ann. Chem. Int. Ed.* 93: S17-S21.

- 65] McGuire R. A., John K. R., Agnew S. G. (1995). Analysis of the torque applied to bone screws by trauma surgeons. Comparisons based on years of experience and material of implant construction. *Am. J. Orthop.* 24: 254-6.
- 66] Jacobs J. J., Gilbert J. L., Urban R. M. (1998). Corrosion of metal orthopaedic implants. *J. Bone Joint Surg.* 80 A: 268-82.
- 67] Wang J. Y., Wicklund B. H., Gustilo R. B., Tsukayama D. T. (1997). Prosthetic metals interfere with the functions of human osteoblast cells in vitro. *Clin Orthop.* 339: 216-26.
- 68] Black J. (1988). ¿Does corrosion matter?. *J. Bone Joint Surg.* 70 B: 517-20
- 69] Khan M. A., Williams R. L., Williams DF. (1999). Cojoint corrosion and wear in titanium alloys. *Biomaterials* 20: 765-72
- 70] Head W. C., Bauk D. J., Emerson R. H. (1995). Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty. *Clin. Orthop.* 311: 85-90.
- 71] Frost H. M. (1988). Vital biomechanics: proposed general concepts for skeletal adaptations to mechanical usage. *Calcif. Tissue Int.* 42: 142-56.
- 72] Lanyon L. E. (1984). Functional strain as a determinant for bone remodeling. *Calcif. Tissue Int.* 36: 56-61
- 73] Huiskes R., Weinans H., Van Rietbergen B. (1992). The relationship between stress shielding and bone resorption around total hip stems and the effects of flexible materials. *Clin. Orthop.* 274:124-34
- 74] Agins H. J., Alcock N. W., Bansal M., Salvati E. A., Wilson P. D. Jr., Pellicci P. M., Bullough P. G. (1988). Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. *J. Bone Joint. Surg.* 70 A: 347-56.
- 75] Hulbert S. F., Cooke F. W., Klawitter J. J., Leonard R. B., Sauer B. W., Moyle D. D., Skinner H. B. (1973). Attachment of prostheses to the musculoskeletal system by tissue ingrowth and mechanical interlocking. *J. Biomed. Mater. Res.* 7: 1-23.
- 76] Buchanan R. A., Rigney E. D., Willians J. M. (1987). Ion implantation of surgical Ti-6Al-4V for improved resistance to wear-accelerated corrosion. *J. Biomed. Mater. Res.* 21: 355-66.
- 77] Grant D. M., Lo W. J., Parker K. G., Parker T. L. (1996). Biocompatible and mechanical properties of low temperature deposited quaternary (TiAlV)N coatings on Ti6Al4V titanium alloy substrates. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 7: 579-84.
- 78] Oonishi H., Okabe H., Ike T., Tsuji E. (1988). Fe-Cr-Al alloy with an alumina layer on the surface. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 523: 38-53.
- 79] Ruiz J., Escudero M. L., Canahua H., Garcia-Alonso M. C. (1999). Optimal conditions for alumina coating formation on the MA956 superalloy for prosthetic bearing applications. *J. Biomed. Mater. Res.* 46: 179-85.

- 80] Yan W-Q., Nakamura T., Kawanabe K., Nishigochi S., Masanori O., Kokubo T. (1997). Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants. *Biomaterials* 18: 1185-90.
- 81] Miyazaki T., Kim H-M., Miyaji F., Kokubo T., Kato H., Nakamura T. (2000). Bioactive tantalum metal prepared by NaOH treatment. *J. Biomed. Mater. Res.* 50: 35-42.
- 82] Kim H-M., Takadama H., Kokubo T., Nishiguchi S., Nakamura T. (2000). Formation of a bioactive graded surface structure on Ti-15Mo-5Zr-3Al alloy by chemical treatment. *Biomaterials* 21: 353-8.
- 83] INCO ALLOY LTD. (1993). Oxide dispersion strengthened superalloys made by mechanical alloying. Ed. Inco Alloys International. 1-8.
- 84] Singer R. F., Gessinger G. H. (1984). ODS strengthened superalloys. In Gessinger G. H. ed. *Powder Metallurgy of Superalloys*. Butterworth and Co. 213-89.
- 85] Chao J., González-Carrasco J. L., Ibañez J., Escudero M. L., González-Doncel G. (1996). Effects of the alumina scale on the room-temperature tensile behaviour of preoxidized MA 956. *Metall. Mater. Trans. A.* 27: 3809-16.
- 86] Garcia-Alonso M. C., Escudero M. L., González-Carrasco J. L., Chao J. (2000). Effect of substrate roughness on the corrosion behaviour of the Al₂O₃/MA 956 system. *Biomaterials* 21: 79-87.
- 87] Escudero M. L., González-Carrasco J. L. (1994). In vitro corrosion behaviour of MA 956 superalloy. *Biomaterials*; 12: 1175-80.
- 88] Escudero M. L., López M. F., Ruiz J., García-Alonso M. C., Canahua H. (1996). Comparative study of the corrosion behaviour of MA 956 and conventional metallic biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 31: 313-7.
- 89] Escudero M. L., González-Carrasco J. L., García-Alonso C., Ramírez E. (1995). Electrochemical impedance spectroscopy of preoxidized MA 956 superalloy during in vitro experiments. *Biomaterials* 16: 735-40.
- 90] Mundy G. (1995). Bone remodeling and its disorders. Martin Dunitz Ltd.
- 91] Kerby J. A., Hattersley G., Collins D. A., Chambers T. J. (1992). Derivation of osteoclasts from hematopoietic colony-forming cells in culture. *J. Bone Miner. Res.* 7: 353-61.
- 92] Jilka R. L., Manolagas S. C. (1996). The cellular and biochemical basis of bone remodeling. In Marcus R., Feldman D. ed. *Osteoporosis*. New York Raven Press. 17-48.
- 93] Burger E. H., Van der Meer J. W. M., Nijweide P. J. (1984). Osteoclast formation from mononuclear phagocytes: role of bone-forming cells. *J. Cell Biol.* 99: 1901-6.
- 94] Suda T., Takahashi N., Martin T. J. (1992). Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* 13: 66-80.
- 95] Aubin J. E., Liu R. (1996). The osteoblast lineage. In Bilezikian J. P., Raisz L. G., Rodan G. A., ed. *Principles of bone biology*. San Diego Academic Press. 51-68.

- 96] Owen M. (1985). Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In Peck W. A., ed. Bone and Mineral Research Annual 3. Elsevier Amsterdam. 1-26.
- 97] Civitelli R., Beyer E. C., Warlow P. M., Robertson A. J., Geist S. T., Steinberg T. H. (1993). Connexin-43 mediates direct intracellular communication in human osteoblastic cell networks. *J. Clin. Invest.* 91: 1888-96.
- 98] Olsen B. R. Collagen biosynthesis. (1981). In Hay E. D. ed. Cell biology of extracellular matrix. New York Plenum Press. 139-77.
- 99] Hauschka P. V., Lian J. B., Cole D. E. C., Gundberg C. M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev.* 69: 990-1047.
- 100] Grzesik W. J., Gehron Robey P. (1994). Bone matrix RGD glycoproteins: immunoprecipitation and their interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 9: 487-96.
- 101] Hauschka P. V., Maurakos a. E., Lafrati M. D., Doleman S. E., Klagsbrum M. (1986). Growth factors in bone matrix isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-sepharose. *J. Biol. Chem.* 261: 12665-74.
- 102] Bourne G. H. Phosphatase and calcification. (1972). In Bourne G. H. ed. The biochemistry and physiology of bone. Vol II. New York Academic Press. 79-120.
- 103] Bonucci E. (1971). The locus of initial calcification in cartilage and bone. *Clin. Orthop.* 78: 108-39.
- 104] McSheehy P. M. J., Chambers T. J. (1986). Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 118: 824-8.
- 105] Rodan G. A., Martin T. J. (1981). Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-a hypothesis. *Calcif. Tissue Int.* 33: 349-51.
- 106] Gehron Robey P., Boskey A. L. (1996). The biochemistry of bone. In Marcus R., Feldman D., ed. Osteoporosis. New York Raven Press. 95-184.
- 107] Nagata T., Bellows C. G., Kasugai S., Butter W. T., Sodek J. (1991). Biosynthesis of bone proteins SPP-1 secreted phosphoprotein-1, osteopontin BSP, bone sialoprotein and SPARC osteonectin in association with mineralized tissue formation by fetal rat calvarial cells in culture. *J. Biochem.* 274: 513-20.
- 108] Robey P. G., Young M. F., Fisher L. W., McClain T. D. (1989). Thrombospondin in an osteoblast-derived component of mineralized extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 108: 719-27.
- 109] Mohan S., Baylink D. J. Bone growth factors. (1991). *Clin. Orthop.* 263: 30-48.
- 110] Parfitt A. M. (1983). The physiological and clinical significance of bone histomorphometric data. In Recker R. R., ed. Bone histomorphometry: techniques and interpretation. Boca Raton, Fla: CRC Press. 143-223.
- 111] Frost H. M. (1964). Bone Biodynamics. Little Brown Boston.

- 112] Raisz L. G. (1999). Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin. Chem.* 45: 1353-8.
- 113] Miyauchi A., Alvarez J., Greenfield E. M. et al. (1991). Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 266: 20369-74.
- 114] Hughes D. E., Tiffée J. C., Li H. H. et al. (1996). Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF β . *Nat. Med.* 7: 1132-6.
- 115] Pfeilschifter J., Mundy G. R. (1987). TGF β stimulates osteoblast activity and is released during the bone resorption process. In: Cohn D. V., Martin T. J. ed. *Calcium regulation and bone metabolism: basic and clinical aspects Vol 9.* Elsevier Amsterdam. 450-4.
- 116] Stein G. S., Lian J. B., Stein J. L., Van Wijnen A. J., Mortecino M. (1996). Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiological Reviews* 2: 593-622.
- 117] Maloney W. J., Jasty M., Harris W. H., Galante J. O., Callaghan J. J. (1990). Endosteal erosion in association with stable uncemented femoral components. *J. Bone Joint Surg.* 75 A: 1025-34.
- 118] Maloney W. J., Jasty M., Rosenberg A., Harris W. H. (1990). Bone lysis in well-fixed cemented femoral components. *J. Bone Joint Surg.* 72 B: 966-70.
- 119] Lennox D. W., Schofield B. H., McDonald D. F., Riley L. H. (1987). A histologic comparison of aseptic loosening of cemented, press-fit and biologic ingrowth prostheses. *Clin. Orthop.* 225: 171-91.
- 120] Rubash H. E., Sinha R. K., Shanbhag A. S., Kim S. Y. (1998). Pathogenesis of bone loss after total hip arthroplasty. *Orthop. Clin. North Am.* 29: 173-86.
- 121] Mckellop H. A. (1995). Wear modes, mechanisms, damage and debris: Separating cause from effect in the wear of total hip replacements. In Galante J. O., Rosenberg A. G., Callaghan J. J. ed. *Total hip revision surgery.* New York Raven Press. 21-39.
- 122] Urban R. M., Jacobs J. J., Tomlinson M. J., Gavrilovic J., Black J., Peoch M. (2000). Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *J. Bone Joint Surg.* 82 A: 457-77.
- 123] Goldring S. R., Schiller A. L., Roelke M., Rourke C. M., O'Neill D. A., Harris W. H. (1983). The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J. Bone Joint Surg.* 65 A: 575-84.
- 124] Santavirta S., Gristina A., Konttinen Y. T. (1992). Cemented versus cementless hip arthroplasty. A review of prosthetic biocompatibility. *Acta Orthop. Scand.* 63: 225-32.
- 125] Santavirta S., Konttinen Y. T., Hoikka V., Eskola A. (1991). Immunopathological response to loose cementless acetabular components. *J. Bone Joint Surg.* 73 B: 38-42.



- 126] Chiba J., Schwendeman L. J., Booth R. E., Crossett L. S., Rubash H. E. (1994). A biochemical, histologic and immunohistologic analysis of membranes obtained from failed cemented and cementless total knee arthroplasty. *Clin Orthop.* 299: 114-24.
- 127] Chiba J., Rubash H. E., Kim K. J., Iwaki Y. (1994). The Characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clin. Orthop.* 300: 304-12.
- 128] Murray D. W., Rushton N. (1991). Mediators of bone resorption around implants. *Clin. Orthop.* 281: 295-304.
- 129] Goldring M. B., Goldring S. R. (1990). Skeletal tissue response to cytokines. *Clin. Orthop.* 258: 245-78.
- 130] Jones L. C., Hungerford D. S. (1987). Cement disease. *Clin. Orthop.* 225: 192-206.
- 131] Shanbhag A. S., Jacobs J. J., Glant T. T., Gilbert J. L., Black J., Galante J. O. (1994). Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. *J. Bone Joint Surg.* 76 B: 60-7.
- 132] Maloney W. J., Smith R. L., Schmalzried T. P., Chiba J., Huene D., Rubash H. (1995). Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement. *J. Bone Joint Surg.* 77 A: 1301-10.
- 133] Dean D. D., Schwartz Z., Liu Y., Blanchard C. R., Agrawal C. M., Mabrey J. D., Sylvia V. L., Lohmann C. H., Boyan B. D. (1999). The effect of ultra-high molecular weight polyethylene wear debris on MG63 osteosarcoma cells in vitro. *J. Bone Joint Surg.* 81 A: 452-61.
- 134] Kadoya Y., Revell P. A., Al-Saffar N., Kobayashi A., Scott G., Freeman A. R. (1996). Bone formation and bone resorption in failed total joint arthroplasties: Histomorphometric analysis with histochemical and immunohistochemical technique. *J. Orthop. Res.* 14: 373-82.
- 135] Jiranek W. A., Machado M., Jasty M., Jevsevar D., Wolfe H. J., Goldring S. R., Goldberg M. J., Harris W. H. (1993). Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *J. Bone Joint Surg.* 75 A: 863-79.
- 136] Hukkanen M., Corbett S. A., Batten J., Konttinen Y. T., McCarthy I. D., Maclouf J., Santavirta S., Hughes S. P. F., Polak J. M. (1997). Aseptic loosening of total hip replacement. *J. Bone Joint Surg.* 79 B: 467-74.
- 137] Shanbhag A. S., Jacobs J. J., Black J., Galante J. O., Glant T. T. (1995). Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro. *J. Orthop. Res.* 13: 792-801.
- 138] Haynes D. R., Rogers S. D., Hay S., Percy M. J., Howie D. W. (1993). The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. *J. Bone Joint Surg.* 75 A: 825-34.

- 139] Glant T. T., Jacobs J. J. (1994). Response of three murine macrophage populations to particulate debris: Bone resorption in organ cultures. *J. Orthop. Res.* 12: 720-31.
- 140] Murray D. W., Rushton N. (1990). Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles. *J. Bone Joint Surg.* 72 B: 988-92.
- 141] Shanbhag A. S., Jacobs J. J., Black J., Galante J. O., Glant T. T. (1994). Macrophage/particle interactions: Effect of size, composition and surface area. *J. Biomed. Mater. Res.* 28: 81-90.
- 142] Nakashima Y., Sun D.-H., Trindade M. C. D., Chun L. E., Song Y., Goodman S. B., Schurman D. J., Maloney W. J., Smith R. L. (1999). Induction of macrophage C-C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles. *J. Bone Joint Surg.* 81 B: 155-62.
- 143] Green T. R., Fisher J., Matthews J. B., Stone M. H., Ingham E. (2000). Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. *J. Biomed. Mater. Res.* 53: 490-7.
- 144] Nakashima Y., Sun D. H., Trindade M. C. D., Maloney W. J., Goodman S. B., Schurman D. J., Smith L. (1999). Signaling pathways for tumor necrosis factor- α and interleukin-6 expression in human macrophages exposed to titanium-alloy particulate debris in vitro. *J. Bone Joint Surg.* 81 A: 603-15.
- 145] Trindade M. C. D., Nakashima Y., Lind M., Sun D.-H., Goodman S. B., Maloney W. J., Schurman D. J., Smith R. L. (1999). Interleukin-4 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α expression by human monocytes in response to polymethylmethacrylate particle challenge in vitro. *J. Orthop. Res.* 17: 797-802.
- 146] Horowitz S. M., Doty S. B., Lane J. M., Burstein A. H. (1993). Studies of the mechanism by which the mechanical failure of polymethylmethacrylate leads to bone resorption. *J. Bone Joint Surg.* 75 A: 802-13.
- 147] Horowitz S. M., Rapuano B. P., Lane J. M., Burstein A. H. (1994). The interaction of the macrophage and the osteoblast in the pathophysiology of aseptic loosening of joint replacements. *Calcif. Tissue Int.* 54: 320-4.
- 148] Horowitz S. M., Gonzales J. B. (1997). Effects of polyethylene on macrophages. *J. Orthop. Res.* 15: 50-56.
- 149] Attawia M. A., Nicholson J. J., Laurencin C. T. (1999). Coculture system to assess biocompatibility of candidate orthopaedic materials. *Clin. Orthop.* 365: 230-6.
- 150] Lind M., Trindade M. C. D., Yaszay B., Goodman S. B., Smith R. L. (1998). Effects of particulate debris on macrophage-dependent fibroblast stimulation in coculture. *J. Bone Joint Surg.* 80 B: 924-30.
- 151] Neale S. D., Haynes D. R., Howie D. W., Murray D. W., Athanasou A. (2000). The effect of particle phagocytosis and metallic wear particles on osteoclast formation and bone resorption in vitro. *The Journal of Arthroplasty* 15: 654-62.

- 152] Goodman S. B., Lind M., Song Y., Smith L. (1998). In vitro, in vivo, and tissue retrieval studies on particulate debris. *Clin. Orthop.* 352: 25-34.
- 153] Kovacs E. J., DiPietro L. A. (1994). Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 8: 854-61.
- 154] Manlapaz M., Maloney W. J., Smith R. L. (1996). In vitro activation of human fibroblasts by retrieved titanium alloy wear debris. *J. Orthop. Res.* 14: 465-72.
- 155] Yao J., Glant T. T., Lark M. W., Mikecz K., Jacobs J. J., Hutchinson N. I., Hoerrner L. A., Kuettner K. E., Galante J. O. (1997). The potential role of fibroblasts in periprosthetic osteolysis: Fibroblast response to titanium particles. *J. Bone Miner. Res.* 10: 1417-27.
- 156] Trindade M. C., Schurman D. J., Maloney W. J., Goodman S. B., Smith R. L. (2000). G-protein activity requirement for polymethylmethacrylate and titanium particle-induced fibroblast interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 51: 360-8.
- 157] Martínez M. E., Medina S., del Campo M. T., Sánchez-Cabezudo M. J., Sánchez M., Munuera L. (1998). Effect of polyethylene on osteocalcin, alkaline phosphatase and procollagen secretion by human osteoblastic cells. *Calcif. Tissue Int.* 62: 453-6.
- 158] Zambonin G., Colucci S., Cantatore F., Grano M. (1998). Response of human osteoblasts to polymethylmethacrylate in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 62: 362-5.
- 159] Allen M. J., Myer B. J., Millett P. J., Rushton N. (1997). The effects of particulate cobalt, chromium and cobalt-chromium alloy on human osteoblast-like cells in vitro. *J. Bone Joint Surg.* 79 B: 475-82.
- 160] Yao J., Cs-Szabo G., Jacobs J. J., Kuettner K. E., Glant T. T. (1997). Suppression of osteoblast function by titanium particles. *J. Bone Joint Surg.* 79 A: 107-12.
- 161] Sun J.-S., Liu H.-C., Chang W. H.-S., Li J., Lin F.-H., Tai H.-C. (1998). Influence of hydroxyapatite particle size on bone cell activities: An in vitro study. *J. Biomed. Mater. Res.* 39: 390-7.
- 162] Lohmann C. H., Schwartz Z., Köster G., Jahn U., Buchhorn G. H., MacDougall M. J., Casasola D., Liu Y., Sylvia V. L., Dean D. D., Boyan B. D. (2000). Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. *Biomaterials.* 21: 551-61
- 163] Sun J.-S., Tsuang Y.-H., Liao C.-J., Liu H.-C., Han Y.-S., Lin F.-H. (1997). The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 37: 324-34.
- 164] Dean D. D., Schwartz Z., Blanchard C. R., Liu Y., Agrawal C. M., Lohmann C. H., Sylvia V. L., Boyan B. D. (1999). Ultrahigh molecular weight polyethylene particles have direct effects on proliferation, differentiation, and local factor production of MG63 osteoblast-like cells. *J. Orthop. Res.* 17: 9-17.

- 165] Vermes C., Roebuch K. A., Chandrasekaran R., Dobal J. G., Jacobs J. J., Glant T. T. (2000). Particulate wear debris activates protein tyrosine kinases and nuclear factor $\kappa\beta$, which down-regulates type I collagen synthesis in human osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 15: 1756-65.
- 166] Shida J., Trindade M. C. D., Goodman S. B., Schurman D. J., Smith R. L. (2000). Induction of interleukin-6 release in human osteoblast-like cells exposed to titanium particles in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 67: 151-5.
- 167] Takei H., Pioletti D. P., Kwon S. Y., Sung K. (2000). Combined effect of titanium particles and TNF-alpha on the production of IL-6 by osteoblast-like cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 52: 382-7.
- 168] Goodman S. B., Fornasier V. L., Kei J. (1988). The effects of bulk versus particulate polymethylmethacrylate on bone. *Clin. Orthop.* 232: 254-62.
- 169] Howie D. W., Vernon-Roberts B., Oakeshott R., Manthey B. (1988). A rat model of resorption of bone at the cement-bone interface in the presence of polyethylene wear particles. *J. Bone Joint Surg.* 70 A: 257-63.
- 170] Goodman S., Aspengerg P., Song Y., Knoblich G., Huie P., Regula D., Lidgren L. (1995). Tissue ingrowth and differentiation in the bone-harvest chamber in the presence of cobalt-chromium-alloy and high-density polyethylene particles. *J. Bone Joint Surg.* 77 A: 1025-35.
- 171] Kubo T., Sawada K., Hirakawa K., Shimizu C., Takamatsu T., Hirasawa Y. (1999). Histiocyte reaction in rabbit femurs to UHMWPE, metal, and ceramic particles in different sizes. *J. Biomed. Mater. Res.* 45: 363-9.
- 172] Brooks R. A., Sharpe J. R., Wimhurst J. A., Myer B. J., Dawes E. N., Rushton N. (2000). The effects of the concentration of high-density polyethylene particles on the bone-implant interface. *J. Bone Joint Surg.* 82 B: 595-600.
- 173] Martínez M. E., Medina S., Sánchez M., del Campo M. T., Esbrit P., Rodrigo A., Martínez P., Sánchez-Cabezudo M. J., Moreno I., Garcés M. V., Munuera L. (1999). Influence of skeletal site of origin and donor age on 1,25(OH)2D3-induced response of various osteoblastic markers in human osteoblastic cells. *Bone* 24: 203-9.
- 174] Martínez M. E., García-Ocaña A., Sánchez M., Medina S., del Campo T., Valin A., Sánchez-Cabezudo M. J., Esbrit P. (1997). Antiproliferative effect of the C-terminal parathyroid hormone-related protein inhibits proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* 12: 778-85.
- 175] Santavirta M. D., Nordstrom D., Metsarinne K., Konttinen Y. T. (1993). Biocompatibility of polyethylene and host response to loosening of cementless total hip replacement. *Clin. Orthop.* 297: 100-10.
- 176] Martínez M. E., del Campo M. T., Medina S., Sánchez M., Sánchez-Cabezudo M. J., Esbrit P., Martínez P., Moreno I., Rodrigo A., Garcés M. V., Munuera L. (1999). Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation. *Calcif. Tissue Int.* 64: 280-6.

- 177] Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 248-54.
- 178] Kassem M., Blum W., Risteli J., Mosekilde L., Eriksen E. F. (1993). Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 52: 222-6.
- 179] Melkko J., Niemi S., Risteli L., Risteli J. (1990). Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen. *Clin. Chem.* 36: 1328-32.
- 180] Risteli J., Niemi S., Trivedi P., Mäentausta O., Mowat A. P., Risteli L. (1988). Rapid equilibrium radioimmunoassay for the amino-terminal propeptide of human type III procollagen. *Clin. Chem.* 34: 715-8.
- 181] Sabokbar A., Millet P. J., Myer B., Rushton N. (1994). A rapid quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner.* 27: 57-67.
- 182] Wergedal J. E., Matsuyama T., Strog D. D. (1992). Differentiation of normal human bone cells by transforming growth factor- β and 1,25(OH) $_2$ D $_3$ vitamin D $_3$. *Metabolism* 41: 42-8.
- 183] Catelas I., Petit A., Marchand R., Zukor D. J., Yahia L'H., Huk O. L. (1999). Cytotoxicity and macrophage cytokine release induced by ceramic and polyethylene particles in vitro. *J. Bone Joint Surg.* 81 B: 516-21.
- 184] Pizzoferrato A., Stea S., Sudanese A., Toni A., Nigrisoli M., Gualtieri G., Squarzone S. (1993). Morphometric and microanalytical analyses of alumina wear particles in hip prostheses. *Biomaterials* 14: 583-7.
- 185] Lincks J., Boyan B. D., Blanchard C. R., Lohmann C. H., Liu Y., Cochran D. L., Dean D. D., Schwartz Z. (1998). Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 19: 2219-32.
- 186] Auf'Mkolk B., Hauschka P. V., Schwartz E. R. (1985). Characterization of human bone cells in primary culture. *Calcif. Tissue Int.* 37: 228-35.
- 187] Beresford J. N., MacDonald B., Gowen M., Couch M., Gallagher J., Sharpe P. T., Poser J. (1983). Further characterization of a system for the culture of human bone cells. *Calcif. Tissue Int.* 35: 637-43.
- 188] Beresford J. N., Gallagher J. A., Poser J. W., Russel R. G. G. (1984). Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH) $_2$ D $_3$, 24,25(OH) $_2$ D $_3$ parathyroid hormone and glucocorticoids. *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* 5: 229-34.
- 189] Lerouge S., Huk O., Yahia L'H, Witvoet J., Sedel L. (1997). Ceramic-ceramic and metal-polyethylene total hip replacements: comparison of pseudomembranes after loosening. *J. Bone Joint Surg.* 79 B: 135-9.

- 190] Josset Y., Oum'Hamed Z., Zarrinpour A., Lorenzato M., Adnet J. J., Laurent-Maquin D. (1999). In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* 47: 481-93.
- 191] Najj A., Harmand M.-F. (1991). Cytocompatibility of two coating materials, amorphous alumina and silicon carbide, using human differentiated cell cultures. *Biomaterials* 12: 690-4.
- 192] Harms J., Mäusle E. (1979). Tissue reaction to ceramic implant material. *J. Biomed. Mater. Res.* 13: 67-87.
- 193] Penk H. (1980). Evaluation of the effect of ceramic and different metallic implant materials on the growth rate of human fibroblast cultures. In *Evaluation of Biomaterials*. Winter G. D., Leray J. L., de Groot K. ed. John Wiley Sons. 399-403.
- 194] Catelas I., Petit A., Zukor D. J., Marchand R., L'Hocine Y., Huk O. L. (1999). Induction of macrophage apoptosis by ceramic and polyethylene particles in vitro. *Biomaterials* 20: 625-30.
- 195] Andersson M. K., Anissian L., Stark A., Bucht E., Fellander-Tasi L., Tsai J. A. (2000). Synovial fluid from loose hip arthroplasties inhibits human osteoblasts. *Clin. Orthop.* 378: 148-54.
- 196] Oliva A., Salerno A., Locardi B., Riccio V., Ragione F. D., Iardino P., Zappia V. (1998). Behaviour of human osteoblasts cultured on bioactive glass coatings. *Biomaterials* 19: 1019-25.
- 197] Marie P. J. (1995). Human endosteal osteoblastic cells: relationship with bone formation. *Calcif. Tissue Int.* 56: 13-6.
- 198] Andrianarivo A. G., Robinson J. A., Mann K. G., Tracy R. P. (1992). Growth on type I collagen promotes expression of the osteoblastic phenotype in human osteosarcoma MG-63 cells. *J. Cell. Physiol.* 153: 256-65.
- 199] Chen T. L., Hauschka P. V., Cabrales S., Feldman D. (1986). The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and dexamethasone on rat osteoblast-like primary cell cultures. Receptor occupancy and functional expression patterns for three different bioresponses. *Endocrinology* 118: 250-9.
- 200] Chavassieux P. M., Chenu C., Valentin-Opran A., Merle B., Delmas P., Hartmann D. J., Saez S., Meunier P. (1990). Influence of experimental conditions on osteoblast activity in human primary bone cell cultures. *J. Bone Miner. Res.* 5: 337-43.
- 201] Beresford J. N., Gallagher J. A., Russell R. G. (1986). 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ and human bone-derived cells in vitro. Effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinology* 119: 1776-85.
- 202] Puleo D. A., Holleran L. A., Doremus R. H., Bizios R. (1991). Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 25: 711-23.
- 203] Majeska R. J., Rodan G. A. (1982). The effect of 1,25(OH)₂D₃ on alkaline phosphatase in osteoblastic osteosarcoma cells. *J. Biol.Chem.* 257: 3362-5.

- 204] Spiess Y. H., Price P. A., Deftos J. L., Manolagas S. C. (1986). Phenotype associated changes in the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on alkaline phosphatase and GLA protein of rat osteoblastic cells. *Endocrinology* 118: 1340-6.
- 205] Stern P. H. (1990). Vitamin D and bone. *Kidney Int.* 38: S17-S21.
- 206] Vrouwenvelder W. C. A., Groot C. G., de Groot K. (1993). Histological and biochemical evaluation of osteoblasts cultured on bioactive glass, hydroxylapatite, titanium alloy, and stainless steel. *J. Biomed. Mater. Res.* 27: 465-75.
- 207] Ducy P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., Story B., Dunstan C., Smith E., Bonadio J., Goldstein S., Gundberg C., Bradley A., Karsenty G. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382: 448-52.
- 208] Defranco D. J., Glowacki J., Cox K. A., Lian J. B. (1991). Normal bone particles are preferentially resorbed in the presence of osteocalcin-deficient bone particles in vivo. *Calcif. Tissue Int.* 49: 43-50.
- 209] Mundy G. R., Poser J. W. (1983). Chemotactic activity of the gamma carboxy glutamic acid containing protein in bone. *Calcif. Tissue Int.* 35: 164-8.
- 210] Aarden L. A., de Groot E. R., Schaap O. L., Lansdorp P. M. (1987). Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 17: 1411-6.
- 211] Chaudhary L. R., Spelsberg T. C., Riggs B. L. (1992). Production of various cytokines by normal human osteoblast-like cells in response to interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α : Lack of regulation by 17 β -estradiol. *Endocrinology* 130: 2528-34.
- 212] Ishimi Y., Miyaura C., Jin C. H., Akatsu T., Abe E., Nakamura Y., Yamaguchi A., Yoshiki S., Matsuda T., Hirano T., Kishimoto T., Suda T. (1990). IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J. Immunol.* 145: 3297-303.
- 213] Sánchez M. C., Bajo M. A., Selgas R., Mate A., Sánchez-Cabezudo M. J., López-Barea F., Esbrit P., Martínez M. E. Influence of bone turnover rate on different osteoblastic markers in osteoblastic cells isolated from dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* (en prensa).
- 214] Lowik C. W., van der Pluijm G., Bloys H., Hoekmank K., , Bijvoet O. L., Aarden L. A., Papapoulos S. E. (1989). Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: A possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 1546-52.
- 215] Van Damme J., Cayphas S., Opendakker G., Billiau A., van Snick J. (1987). Interleukin 1 and poly(rI)poly(rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblasts. *Eur. J. Immunol.* 17: 1-7.
- 216] De Miguel F., Martínez-Fernández P., Guillén C., Valin A., Rodrigo A., Martínez M. E., Esbrit P. (1999). Parathyroid hormone-related protein (107-109) stimulates interleukin-6 expression in human osteoblastic cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 796-803.

- 217] Kurihara N., Bertolini D., Suda T., Akiyama Y., Roodman G. D. (1990). IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J. Immunol.* 144: 4226-30.
- 218] Manolagas S. C., Jilka R. L. (1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 332: 305-11.
- 219] Roodman G. D. (1993). Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif. Tissue Int.* 53 (Suppl 1): S94-S98.
- 220] Rader C. P., Sterner T., Jakob F., Schütze N., Eulert J. (1999). Cytokine response of human macrophage-like cells contact with polyethylene and pure titanium particles. *The Journal of Arthroplasty.* 14: 840-8.
- 221] Haynes D. R., Hay S. J., Rogers S. D., Ohta S., Howie D. W., Graves S. E. (1997). Regulation of bone cells by particle-activated mononuclear phagocytes. *J. Bone Joint Surg. (Br)* 79 B: 988-94.
- 222] Horowitz S. M., Gonzales J. B. (1996). Inflammatory response to implant particulates in a macrophage/osteoblast coculture model. *Calcif. Tissue Int.* 59: 392-6.
- 223] Gonzales J. B., Purdon M. A., Horowitz S. M. (1996). In vitro studies on the role of titanium in aseptic loosening. *Clin. Orthop.* 330: 244-50.
- 224] Schwarz E. M., Lu A. P., Goater J. J., Benz E. B., Kollias G., Rosier R. N., Puzas J. E., O'Keefe R. J. (2000). Tumor necrosis factor-alpha/nuclear transcription factor-kbeta signaling in periprosthetic osteolysis. *J. Orthop. Res.* 18: 472-80.
- 225] Algan S. M., Purdon M., Horowitz S. M. (1996). Role of tumor necrosis factor alpha in particulate-induced bone resorption. *J. Orthop. Res.* 14: 30-5.
- 226] Hierl T., Borcsok I., Sommer U., Ziegler R., Kasperk C. (1998). Regulation of inteleukin-6 expression in human osteoblastic cells in vitro. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 106: 324-33.

Anexo

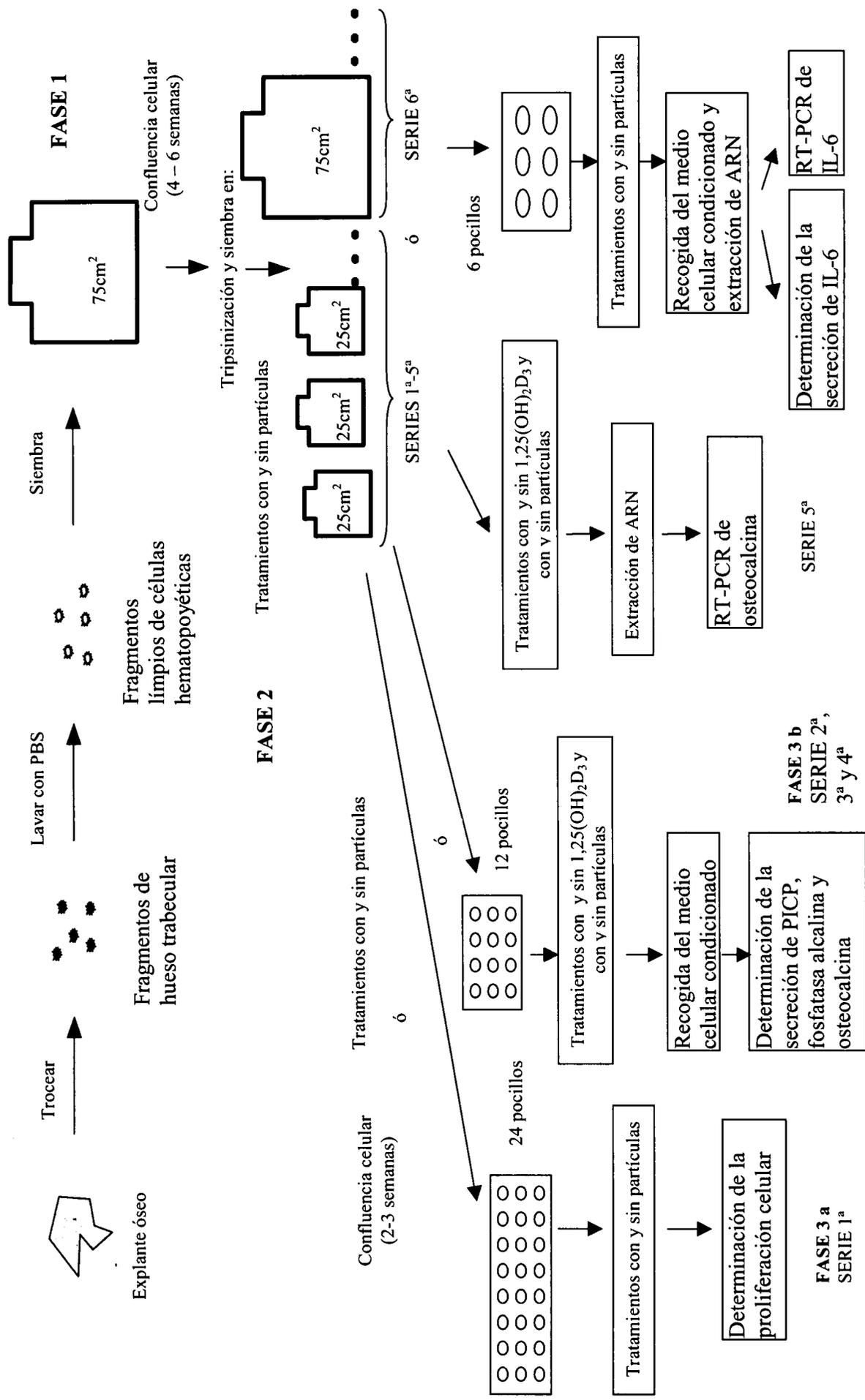


Fig. 6. Procesamiento de los explantes óseos y desarrollo de los experimentos.

Publicaciones del autor relacionadas con esta tesis:

- ◆ **Rodrigo A. M.**, Martínez M. E., Martínez P., Escudero M. L., Ruíz J., Saldaña L., Gómez-García L. (2001). Effects of MA 956 superalloy and α -alumina particles on some markers of human osteoblastic cells in primary culture. *J. Biomed. Mater. Res.* 54: 30-6.
- ◆ **Rodrigo A. M.**, Martínez M. E., Escudero M. L., Ruíz J., Martínez P., Saldaña L., Gómez-García L., Fernández L., Cordero J., Munuera L. (2000). Influence of particle size in the effect of polyethylene on human osteoblastic cells. *Biomaterials* (en prensa).
- ◆ **Rodrigo A. M.**, Martínez M. E., Medina S., Escudero M. L., Ruíz J., Martínez P., Munuera L. (2000). Efecto del polietileno sobre las células osteoblásticas humanas: influencia del tamaño de partícula. *Maphre Medicina* 11:81-7
- ◆ Martínez M. E., Medina S., del Campo M. T., García J. A., **Rodrigo A. M.**, Munuera L. (1998). Effect of polyethylene particles on human osteoblastic cell growth. *Biomaterials* 19: 183-7.
- ◆ **Rodrigo A. M.**, Martínez M. E., Saldaña L., Vallés G., Martínez P., González J. L., Cordero J., Munuera L. Effects of polyethylene and α -alumina particles on IL-6 expression and secretion in primary cultures of human osteoblastic cells. *Biomaterials* (enviado).

Publicaciones del autor relacionadas indirectamente con esta tesis:

- ◆ De Miguel F., Martínez-Fernández P., Guillén C., Valin A., **Rodrigo A.**, Martínez M. E., Esbrit P. (1999). Parathyroid hormone-related protein (107-109) stimulates interleukin-6 expression in human osteoblastic cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 796-803.
- ◆ Martínez M. E., del Campo M. T., Medina S., Sánchez M., Sánchez-Cabezudo M. J., Esbrit P., Martínez P., Moreno I., **Rodrigo A.**, Garcés M. V., Munuera L. (1999).

Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation. *Calcif. Tissue Int.* 64: 280-6.

- ◆ Martínez M. E., Medina S., Sánchez M., del Campo M. T., Esbrit P., **Rodrigo A.**, Martínez P., Sánchez-Cabezudo M. J., Moreno I., Garcés M. V., Munuera L. (1999). Influence of skeletal site of origin and donor age on 1,25(OH)₂D₃-induced response of various osteoblastic markers in human osteoblastic cells. *Bone* 24: 203-9.
- ◆ Martínez P., **Rodrigo A. M.**, Martínez M. E. (1998). Variaciones de la función osteoblástica según la edad y la localización. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*.

