

Guede D^{1,2}, Pereiro I³, Solla E³, Serra J³, López-Peña M⁴, Muñoz F⁴, González-Cantalapiedra A⁴, Caeiro JR^{2,5}, González P³

1 Trabeculae - Empresa de Base Tecnológica, S.L. - Ourense

2 Red Temática de Investigación en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) - Instituto de Salud Carlos III - Ministerio de Economía y Competitividad - Madrid

3 Grupo de Nuevos Materiales - Departamento de Física Aplicada - Universidad de Vigo - Pontevedra

4 Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias - Facultad de Veterinaria - Universidad de Santiago de Compostela - Lugo

5 Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología - Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela - A Coruña

Osteointegración y biocompatibilidad *in vivo* de cerámicas bioinspiradas de carburo de silicio en un modelo experimental en conejo

Correspondencia: David Guede - Trabeculae, S.L. Parque Tecnológico de Galicia - Edificio "Tecnópole I" Local 22 - 32900 San Cibrao das Viñas - Ourense (España)
Correo electrónico: dguede@trabeculae.com

Fecha de recepción: 27/07/2012

Fecha de aceptación: 02/11/2012

Trabajo becado por la FEIOMM para asistir al 33 Congreso de la ASBMR (San Diego, 2011)

Resumen

Fundamento: La nueva generación de materiales para implantes debe imitar las estructuras jerárquicas de la naturaleza. El carburo de silicio bioinspirado (bioSiC) es una cerámica producida a partir de madera, que presenta una estructura similar al hueso, con la propiedad única de una porosidad interconectada, que permite el crecimiento interno de los tejidos y favorece la angiogénesis.

Objetivos: Valorar la biocompatibilidad y osteointegración del bioSiC en defectos óseos femorales en un modelo experimental en conejo.

Material y métodos: Se obtuvieron 36 cilindros de bioSiC mediante pirólisis de madera de sapelli e infiltración con silicio fundido de la preforma de carbono resultante. Dieciocho cilindros se recubrieron con Si-HA por deposición con láser pulsado. Los cilindros se implantaron en cóndilos femorales de conejos que se sacrificaron a las 1, 4 ó 12 semanas. Las muestras se analizaron histológicamente mediante microscopía óptica y por microtomografía computarizada para evaluar el crecimiento de hueso.

Resultados: Los implantes de bioSiC mostraron una buena osteointegración presentando tanto crecimiento hacia fuera (*ongrowth*) como hacia dentro (*ingrowth*). A las 4 semanas de la implantación la integración era casi completa, sin diferencias frente a las 12 semanas. El recubrimiento no mejora el valor de ningún parámetro con respecto a los implantes no recubiertos.

Conclusiones: Las cerámicas de bioSiC fabricadas a partir de madera porosa presentan una buena osteointegración y su porosidad interconectada es colonizada por el tejido óseo. No requieren además la bioactividad de un revestimiento para mejorar la aposición de hueso neoformado. El bioSiC se erige como un material a tener en cuenta en aplicaciones biomédicas.

Palabras clave: carburo de silicio, sustitutos óseos, osteointegración, técnicas histológicas, microtomografía computarizada de rayos X.

Osteointegration and biocompatibility *in vivo* of bio-inspired silicon carbide ceramics in an experimental model in rabbits

Summary

Background: The new generation of materials for implants should imitate the hierarchical structures found in nature. Bio-inspired silicon carbide ceramic (bioSiC) is a ceramic produced from wood, which has a similar structure to bone, with a unique property of interconnected porosity, which allows the internal growth of tissue and favours angiogenesis.

Objectives: To evaluate the biocompatibility and osteointegration of bioSiC in femoral bone defects in an experimental model in rabbits.

Material and methods: 36 cylinders of bioSiC were obtained through pyrolysis of sapelli wood and infiltration with molten silicon of the resulting carbon preform. Eighteen cylinders were coated with Si-HA by pulsed laser deposition. The cylinders were implanted in femoral condyles of rabbits which were sacrificed at 1, 4 or 12 weeks. The samples were analysed histologically using an optical microscope and computerised microtomography to assess bone growth.

Results: The bioSiC implants showed good osteointegration, there being both outward growth (ongrowth) and inward growth (ingrowth). At 4 weeks from implantation the integration was almost complete, with no difference from that seen at 12 weeks. The coating did not improve the value of any parameter with respect to the non-coated implants.

Conclusions: BioSiC ceramics produced from porous wood have good osteointegration and their interconnected porosity is colonised by bone tissue. In addition, they do not require the bioactivity of a coating to improve the apposition of neoformed bone. BioSiC stands as a material to be taken into account in biomedical applications.

Key words: *silicon carbide, bone substitutes, osteointegration, histological techniques, X-ray computerised microtomography.*

Introducción

Tradicionalmente, los defectos óseos se han tratado implantando tejido autólogo (procedente del propio paciente), alogénico (procedente de otro individuo de la misma especie) o xenogénico (obtención de hueso de un animal de otra especie), o bien implantando materiales sustitutos. Los autoinjertos, aunque han mostrado un alto porcentaje de éxito, se ven limitados por la cantidad de tejido que puede extraerse y por la morbilidad del sitio de extracción¹. Por su parte, los aloinjertos y los xenoinjertos (estos últimos mucho menos utilizados) pueden causar reacciones inmunes y transmitir patógenos al paciente. Con respecto a los sustitutos óseos sintéticos, todos ellos gozan de una serie de ventajas sobre los injertos de hueso, como su ilimitada disponibilidad o su sencilla esterilización. Sin embargo, a pesar de su gran variabilidad, el principal problema de todos estos materiales es su limitación para proporcionar soporte mecánico a la zona afectada². Las demandas actuales de la ingeniería de tejidos para la regeneración de tejido óseo plantean nuevos retos en ciencia de materiales e ingeniería biomédica. Así surge una tendencia tecnológica basada en la biomimética para el desarrollo de nuevos biomateriales, que se inspiren en los modelos y bioestructuras que nos ofrece la naturaleza, y que han sido perfeccionados y optimizados a lo largo del proceso evolutivo.

Los materiales cerámicos bioinspirados, basados en precursores naturales como madera, plantas o algas, reúnen varios de los requisitos que se

le exigen a esa nueva generación de biomateriales: buenas prestaciones biomecánicas, ligeros, tenaces y con una estructura con porosidad jerarquizada e interconectada que se asemeja al tejido óseo para favorecer el crecimiento de tejido en su interior y la angiogénesis, es decir, la osteointegración del material en el tejido huésped³. Las cerámicas de carburo de silicio bioinspiradas (bioSiC) reúnen los requisitos biomecánicos adecuados para utilizarse como sustituto óseo. Estas cerámicas pueden ser fabricadas a partir de diversas estructuras naturales^{4,5}. El proceso tecnológico de fabricación se basa en la ceramización de los precursores naturales, obteniéndose como resultado final una pieza de carburo de silicio con una porosidad interconectada que mantiene la jerarquía estructural en cuanto a tamaño y distribución de poros del original.

Los ensayos mecánicos indican que las propiedades de estos materiales pueden ser ajustadas a medida, mediante una selección apropiada del precursor vegetal de partida, dependiendo de las características del tipo de hueso que se pretenda reparar, y modificando las condiciones experimentales de fabricación. Así, a semejanza del hueso, cabe señalar que el bioSiC presenta propiedades mecánicas anisotrópicas con valores que se comparan positivamente con los del hueso. A modo de ejemplo, el bioSiC obtenido a partir de madera de sapelli (*Entandrophragma cylindricum*) presenta valores de resistencia a la compresión en dirección longitudinal (eje de crecimiento del árbol) de 210 ± 20 a 1.160 ± 100 MPa, y en dirección

radial desde 120 ± 10 a 430 ± 50 MPa, en función de la cantidad de Si infiltrado⁶⁷. La resistencia a la compresión de especímenes de hueso cortical humano varía entre 167 y 215 MPa⁸.

La biocompatibilidad de un material se refiere a la capacidad de funcionar como un sustrato que soportará la actividad celular apropiada, facilitando los sistemas de señalización molecular y mecánica, con el fin de optimizar la regeneración de los tejidos, sin provocar reacciones indeseables en el huésped⁹. El objetivo de este estudio ha sido comprobar la capacidad de osteointegración de cerámicas de bioSiC en un modelo animal de defecto óseo en conejo, comprobando su biocompatibilidad *in vivo* mediante la comparación de implantes sin recubrimiento e implantes con un recubrimiento bioactivo.

Material y métodos

Fabricación de SiC bioinspirado

El proceso de fabricación de las cerámicas bioinspiradas consiste en dos fases básicas. La primera de ellas es el proceso de pirolización, donde el precursor natural seco o liofilizado se somete a alta temperatura en condiciones inertes. Se procede al calentamiento de la muestra con una rampa controlada de $2^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta $600\text{-}800^\circ\text{C}$; se mantiene a esta temperatura durante 1 h y se enfría lentamente hasta temperatura ambiente. El material resultante es una proforma carbonácea que mantiene todos los detalles bioestructurales del sistema vascular del precursor original.

La segunda fase consiste en un proceso de infiltración, donde la proforma de carbón se cubre con polvo de silicio y se expone a alta temperatura en un horno controlable en condiciones de vacío. Se alcanza una temperatura de 1.550°C , a razón de $5\text{-}10^\circ\text{C}/\text{min}$, se mantiene 30 min a temperatura máxima, se procede al enfriado controlado a $20^\circ\text{C}/\text{min}$ y se obtiene una pieza de carburo de silicio.

Para este estudio se obtuvieron 36 cilindros de bioSiC a partir de madera de sapelli, de los cuales 18 se recubrieron con Si-HA (7,5 at. %) mediante deposición por láser pulsado (PLD). La fabricación de los recubrimientos de Si-HA se llevó a cabo con un láser excímero (193 nm, 175 mJ y 10 Hz) a partir de una pastilla sintética de hidroxiapatita (HA) y silicio en polvo (7,5 at. % de Si). El depósito se realizó en una atmósfera de vapor de agua (0,45 mbar) manteniendo el sustrato de bioSiC a 460°C durante el crecimiento del recubrimiento.

Modelo animal

Para investigar la biocompatibilidad *in vivo* del material, se diseñó un modelo experimental de defecto óseo en fémur de conejo. Los cilindros de bioSiC se implantaron en los cóndilos laterales de los fémures de 18 conejos *New Zealand*, para lo que se realizó un abordaje lateral longitudinal distal sobre el muslo de ambas extremidades. Con una broca se practicó un orificio en la epífisis distal del fémur donde se implantó aleatoriamente un cilindro de bioSiC sin recubrimiento o un cilindro de bioSiC con recubrimiento bioactivo de Si-HA. Los animales se sacrificaron mediante administración intravenosa de

pentobarbital sódico a las 1, 4 y 12 semanas tras la implantación y se obtuvieron las muestras que fueron fijadas en formol tamponado al 10%. De este modo, se obtuvieron 6 grupos experimentales ($n=6$), los tres primeros con implantes sin recubrimiento a los tres tiempos de estudio, y los tres últimos con implantes recubiertos. Todos los experimentos se han llevado a cabo conforme a la Ley 14/2007 y al Real Decreto 1201/2005, y siguiendo las directrices de las normas UNE-EN 30993-3:1994 e ISO 10993-2:2006.

Análisis histológico

Las muestras se procesaron para su estudio utilizando las técnicas de inclusión en metacrilato descritas por Donath¹⁰ siguiendo los pasos de fijación, deshidratación, infiltración, inclusión y polimerización. Posteriormente se realizaron secciones longitudinales del cóndilo del fémur de aproximadamente $30\ \mu\text{m}$ de espesor, que fueron teñidas mediante la tinción de Lévai-Laczko.

Una vez preparadas, las muestras se observaron con lupa binocular y se estimó la fracción del área total de poros ocupada por hueso, la cantidad de hueso neoformado en la periferia del implante y el porcentaje de la superficie del implante en contacto con hueso¹¹. La calibración posterior se realizó con la aplicación informática Microimage.

Análisis mediante micro-CT

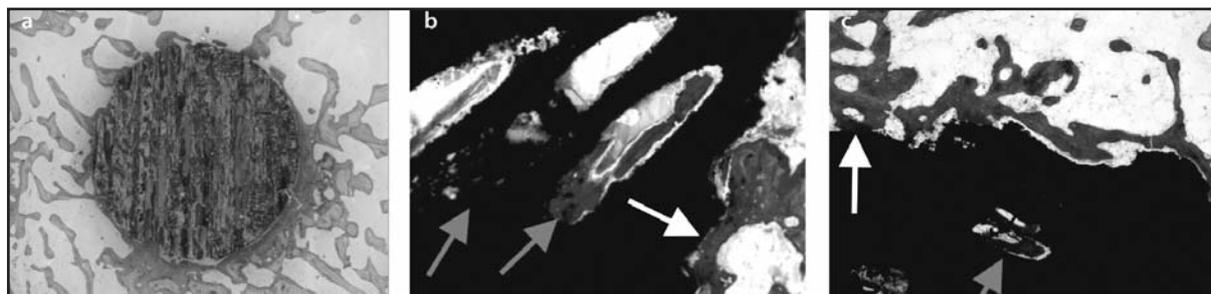
La formación de hueso alrededor del implante se analizó también mediante microtomografía computarizada (micro-CT). Las muestras se escaneron mediante un microtomógrafo de rayos X de alta resolución SkyScan 1172 (Bruker micro CT NV, Kontich, Bélgica) a 60 kV y $167\ \mu\text{A}$ de intensidad de la fuente de rayos X. Se empleó una resolución nominal de $7,90\ \mu\text{m}$ y un filtro de Al de 1 mm de grosor para obtener un intervalo restringido de longitudes de onda. El paso de rotación fue de $0,2^\circ$ con una rotación total de 360° y un valor de *frame averaging* (imágenes por paso) de tres. Las imágenes obtenidas se reconstruyeron mediante el algoritmo de Feldkamp modificado¹² y se analizaron mediante la aplicación comercial CTAnalyzer (Bruker micro CT NV, Kontich, Bélgica). Para ello, se seleccionó un volumen de interés de un grosor de $160\ \mu\text{m}$ desde la superficie del implante, en el que se determinó la fracción volumétrica ósea (BV/TV). Se calculó además la superficie de intersección del hueso con el implante refiriéndola a la superficie total del implante (i.S/TS).

Análisis estadístico

Los datos recogidos del estudio se introdujeron en una base de datos de texto que se exportó posteriormente al paquete estadístico SPSS 18.0 (IBM, Armonk, NY, USA) para su posterior análisis estadístico. Seguidamente se procedió con el análisis descriptivo de las variables de estudio. Los datos estadísticos descriptivos de las variables numéricas se expresaron como media \pm desviación estándar.

El estudio estadístico comparativo de todos los resultados numéricos obtenidos para los distintos grupos de estudio se llevó a cabo mediante la apli-

Figura 1. Imágenes histológicas de un cilindro de bioSiC tras 12 semanas de implantación: a) se observa crecimiento óseo alrededor y dentro de los poros del implante, sin apreciarse tejido fibroso separando hueso e implante; b y c) se observa la colonización de la porosidad por el tejido óseo a mayor magnificación y el contacto del mismo con la cerámica biomórfica



cación del test *U* de Mann-Whitney debido a que las variables no superaban los criterios de normalidad aplicados. La relación existente entre los resultados obtenidos mediante histología y micro-CT se estudió con la correlación de Pearson.

El nivel de significación estadística se estableció en valores de $p < 0,05$ para todas las variables analizadas.

Resultados

La biocompatibilidad *in vitro* de las cerámicas de bioSiC se demostró mediante el cultivo de la línea celular osteoblástica humana MG-63 en un estudio previo⁷. Para investigar la biocompatibilidad *in vivo* de estas biocerámicas se llevó a cabo un modelo experimental en fémur de conejo. Los cortes histológicos obtenidos de las muestras tras la implantación se examinaron mediante microscopía óptica y microtomografía computarizada.

Mediante el análisis histológico, se puede observar crecimiento de hueso neoformado en la superficie de los implantes, no apreciándose signos de inflamación ni aparición de tejido fibroso alrededor de las muestras. Es destacable que el hueso neoformado penetra por los poros de la misma. A mayores aumentos en el microscopio podemos comprobar dicha colonización así como el contacto óseo con el implante, lo cual representa una característica resaltante (Figura 1).

En los implantes sin recubrimiento, a la primera semana de implantación se observa que un 10,38% del área de poros ha sido colonizada por hueso nuevo, porcentaje que aumenta hasta el 37,52% a las 4 semanas ($p=0,017$). En el área seleccionada en la periferia del implante, el hueso neoformado a la primera semana ocupa el 21,25%, mientras que a las 4 semanas es del 32,30% ($p=0,030$). A las 12 semanas no se observan diferencias en ninguna variable con respecto a las muestras de las 4 semanas (Figura 2).

En el análisis con micro-CT, la región de interés seleccionada para el análisis del crecimiento de hueso fue de 160 μm desde la superficie del implante. Tras la primera semana de la colocación de los implantes de bioSiC, el BV/TV de la región analizada fue de 11,49%, lo que implica que del volumen analizado alrededor del implante, dicho porcentaje

estaba ocupado por hueso. A las 4 semanas, el BV/TV se incrementó hasta 45,36% ($p=0,030$ vs. 1ª semana). El valor a las 12 semanas no muestra diferencias significativas frente al valor de las 4 semanas. Del mismo modo, la i.S/TS, que representa el porcentaje de la superficie del implante en contacto con hueso, aumenta hasta la cuarta semana, tras la cual su valor parece estabilizarse, quedando aproximadamente la mitad de la superficie del implante en contacto con hueso neoformado. No se han encontrado tampoco diferencias entre los grupos de las 4 y 12 semanas (Figuras 2 y 3).

Se ha estudiado la relación existente entre los resultados obtenidos con ambas técnicas, mediante correlación de Pearson. El BV/TV calculado por micro-CT presenta una correlación positiva con el porcentaje de hueso neoformado en la periferia determinado mediante histología ($r=0,588$, $p < 0,001$); de igual modo que la superficie de intersección microtomográfica (i.S/TS) con el porcentaje de contacto óseo histológico ($r=0,677$, $p < 0,001$) (Figura 4).

Discusión

La naturaleza ofrece una gran variedad de especies con porosidad muy diversa, por lo que debemos seleccionar el precursor original más adecuado para la estructura ósea que se desee replicar. Entre sus características comunes destaca la disposición de una estructura porosa jerárquica que se replica en las cerámicas bioinspiradas.

En el caso del sapelli, observamos una combinación de macrocanales con un diámetro entre 80 y 100 μm , que tienen incidencia en la promoción de la vascularización, transporte de nutrientes y productos de desecho. También se observan microporos de unos 4 μm que participan en la formación de la capilaridad⁷. Por otro lado, es destacable la presencia de poros en la escala nanométrica, que juegan un papel interesante en aspectos relacionados con la difusión molecular para la nutrición y señalización. La interconexión de los poros proporciona el canal para la migración celular y permite la formación de vasos sanguíneos; y la rugosidad del material contribuye a incrementar el área superficial favoreciendo la adsorción de proteínas y el intercambio iónico³.

Figura 2. Representación gráfica de los resultados de las variables estructurales obtenidas mediante micro-CT: a) fracción volumétrica ósea (BV/TV), b) porcentaje de superficie de intersección del hueso con el implante (i.S/TS); y mediante histología: c) porcentaje de área de hueso formado en la periferia del implante, d) porcentaje de la superficie del implante en contacto con hueso, y e) porcentaje de área de hueso formado en el interior del implante en relación al área total de poros

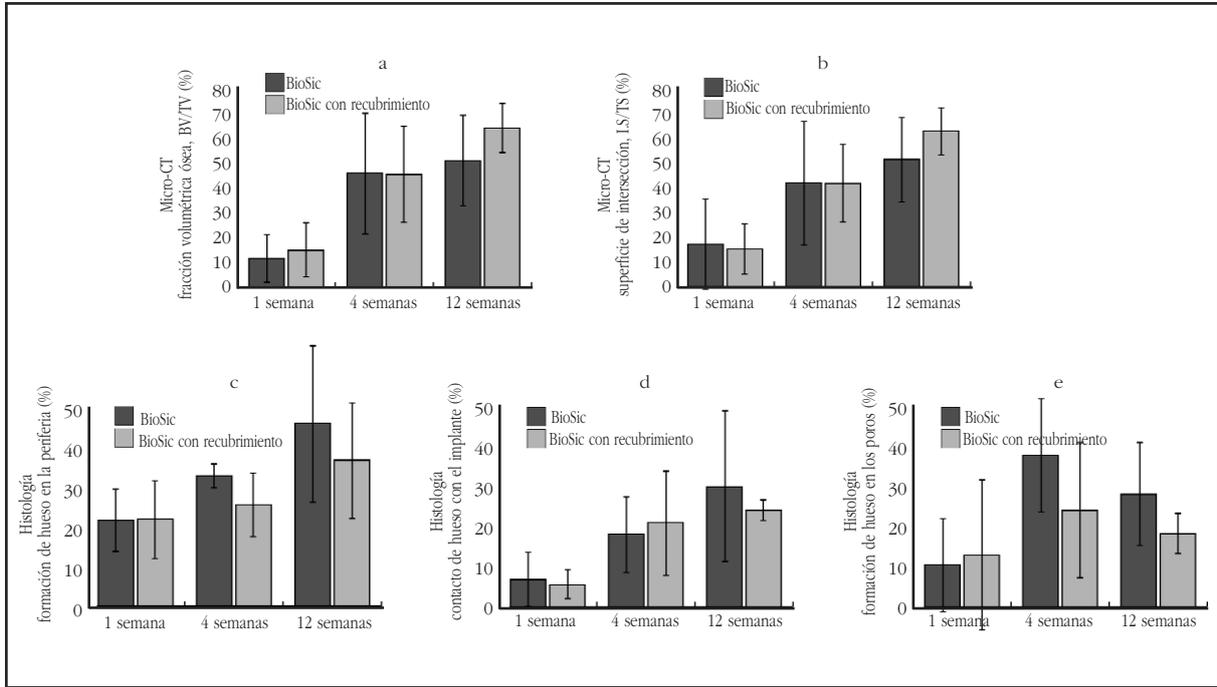


Figura 3. Modelos tridimensionales de las cerámicas de bioSiC a las 1, 4 y 12 semanas (a, b y c) y de bioSiC con recubrimiento bioactivo de Si-HA (d, e y f). Los cilindros cerámicos se representan en gris oscuro el hueso neoformado en la periferia del implante en gris claro

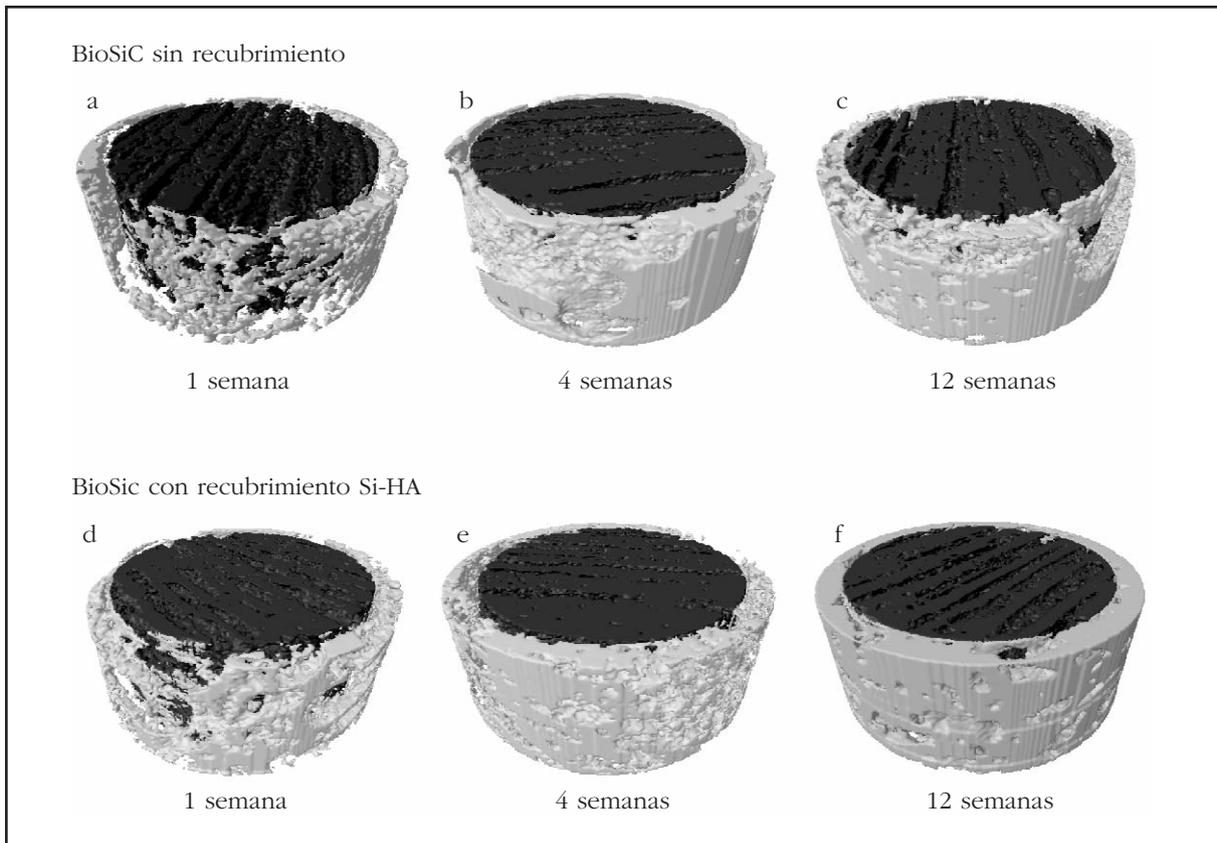
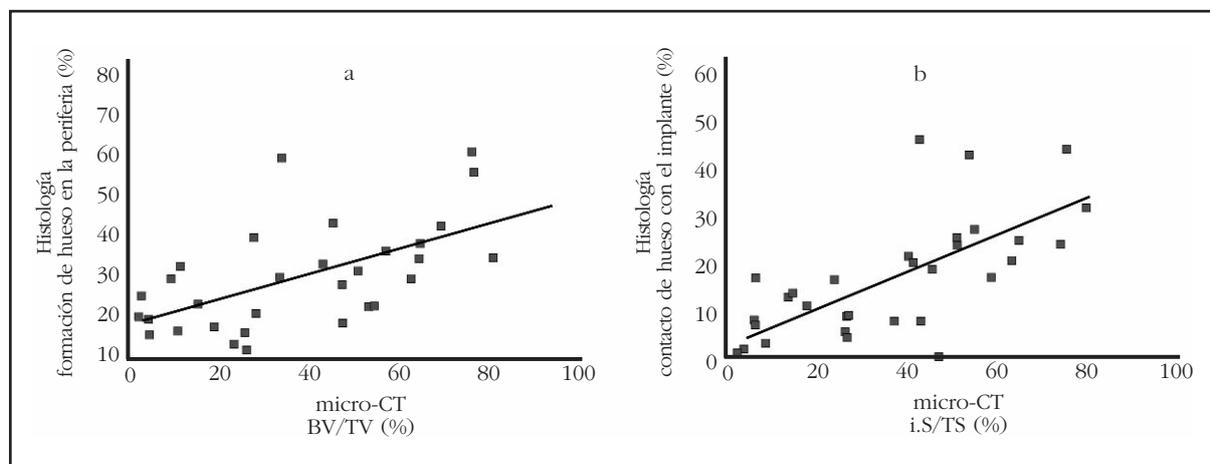


Figura 4. Diagramas de dispersión con los datos de los parámetros obtenidos mediante micro-CT e histología: a) la fracción volumétrica ósea microtomográfica frente a la formación de hueso en la periferia determinada por histología, ambas variables que cuantifican el hueso formado alrededor de los implante de bioSiC; b) el porcentaje de la superficie del implante en contacto con hueso, medida por micro CT y por histología



De los valores obtenidos tanto mediante el análisis histológico como del análisis microestructural con micro-CT se deduce que la osteointegración se completa a las 4 semanas. Ninguno de los parámetros analizados por una u otra técnica muestra diferencias significativas entre las muestras de 4 y 12 semanas, ya sea en las muestras con recubrimiento o en las que carecen de él. Las muestras en las que se ha aplicado el recubrimiento de Si-HA no presentan diferencias significativas frente a las muestras de bioSiC sin recubrimiento para ninguna de las variables analizadas. De este hecho se deduce que las cerámicas bioinspiradas de SiC no necesitan de la aportación del recubrimiento para resultar biocompatibles, y el recubrimiento no mejora su contacto con el hueso.

Las cerámicas bioinspiradas de carburo de silicio presentan por tanto un alto potencial como nuevo biomaterial para aplicaciones biomédicas. Se demuestra la viabilidad de producción de dispositivos cerámicos ligeros, tenaces y con porosidad interconectada susceptibles de utilizarse como sustituto óseo. Los ensayos *in vivo* de implantes de bioSiC indican que la porosidad de este biomaterial es colonizada por tejido óseo y se favorece su mineralización. También se comprueba que presenta una buena aposición de hueso neoformado y una adecuada osteointegración en tiempos relativamente cortos tras la implantación.

Bibliografía

1. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004;4:743-65.
2. Vicario Espinosa C. Los aloinjertos óseos en Cirugía Ortopédica y Traumatología (1). *Patología Aparato Locomot* 2004;2:214-32.
3. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE

(eds). *Biomaterials Science: Introduction to Materials in Medicine*, 2nd Edition. London: Elsevier Academic Press; 2004.

4. Martínez-Fernández J, Varela-Feria FM, Singh M. High temperature compressive mechanical behavior of biomorphic silicon carbide ceramics. *Scr Mater* 2000;43:813-8.
5. De Arellano-López AR, Martínez-Fernández J, González P, Domínguez C, Fernández-Quero V, Singh M. Biomorphic SiC: A new engineering ceramic material. *Int J Appl Ceram Technol* 2004;1:56-67.
6. Kardashev BK, Burenkov YuA, Smirnov BI, de Arellano-López AR, Martínez-Fernández J, Varela-Feria FM. Elasticity and inelasticity of biomorphic silicon carbide ceramics. *Phys Solid State* 2004;46:1873-7.
7. González P, Borrajo JP, Serra J, Chiussi S, León B, Martínez-Fernández J, et al. A new generation of bio-derived ceramic materials for medical applications. *J Biomed Mater Res A* 2009;88:807-13.
8. An YH. Mechanical properties of bone. In: An YH, Draughn RA (eds.). *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface*. Boca Raton, Florida, (USA): CRC Press; 2000.
9. Williams D. Revisiting the definition of biocompatibility. *Med Device Technol* 2003;14:10-3.
10. Donath K. Preparation of histologic sections by the cutting-grinding technique for hard tissue and other material not suitable to be sectioned by routine methods. Norderstedt: Institute for Pathologie, University of Hamburg; Exakt-Kulzer-Publication; 1995.
11. Tonino AJ, Thèrin M, Doyle C. Hydroxyapatite-coated femoral stems: Histology and histomorphometry around five components retrieved at post mortem. *J Bone Joint Surg Br* 1999;81:148-54.
12. Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW. Practical cone-beam algorithm. *J Opt Soc Am A* 1984;1:612-9.