



UNC



FCEyN



Ingeniería
Biomédica

Sistematización de modelo experimental *in vivo* para evaluación de biomateriales como reemplazo óseo

Bianchi, Julián – Maturana Stefanía

Diciembre de 2016

Proyecto Integrador

Alumnos

BIANCHI, Julián

MATURANA, Stefanía

Asesores

Ing. GRINSCHPUN, Luciano

Dra. SUÁREZ, Marta

Dra. RIVAROLA, Angélica



MARCO TEÓRICO

Sistematización

Modelo
experimental
diseñado en 2015



Encuadre
regulatorio y
normativo



“Tipos de
ensayos” para
biomateriales



Mejoras en
técnicas de
implementación

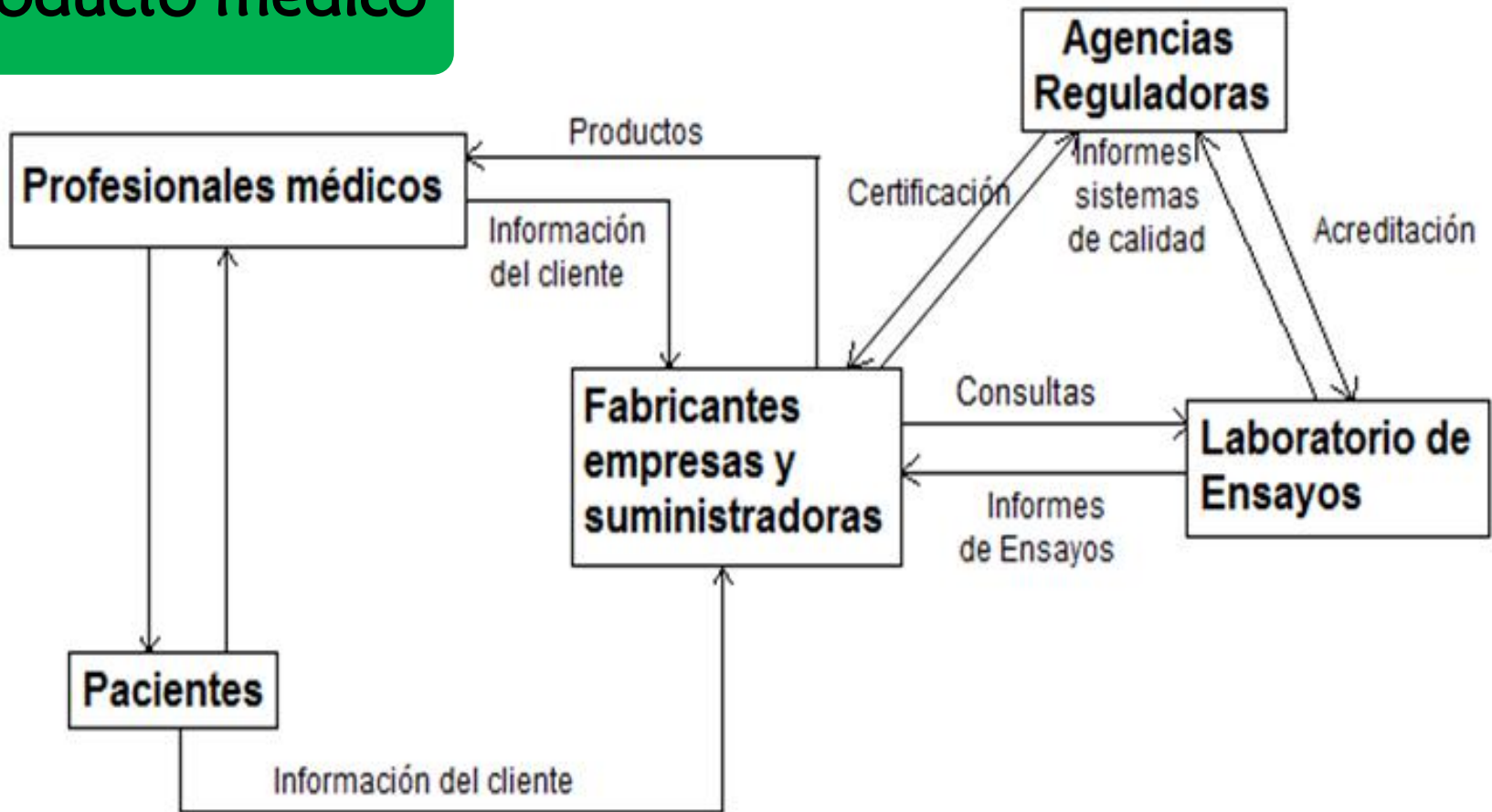


Análisis y
evaluación
de resultados



Marco regulatorio de PM implantables

Ciclo de vida del producto médico



ANMAT

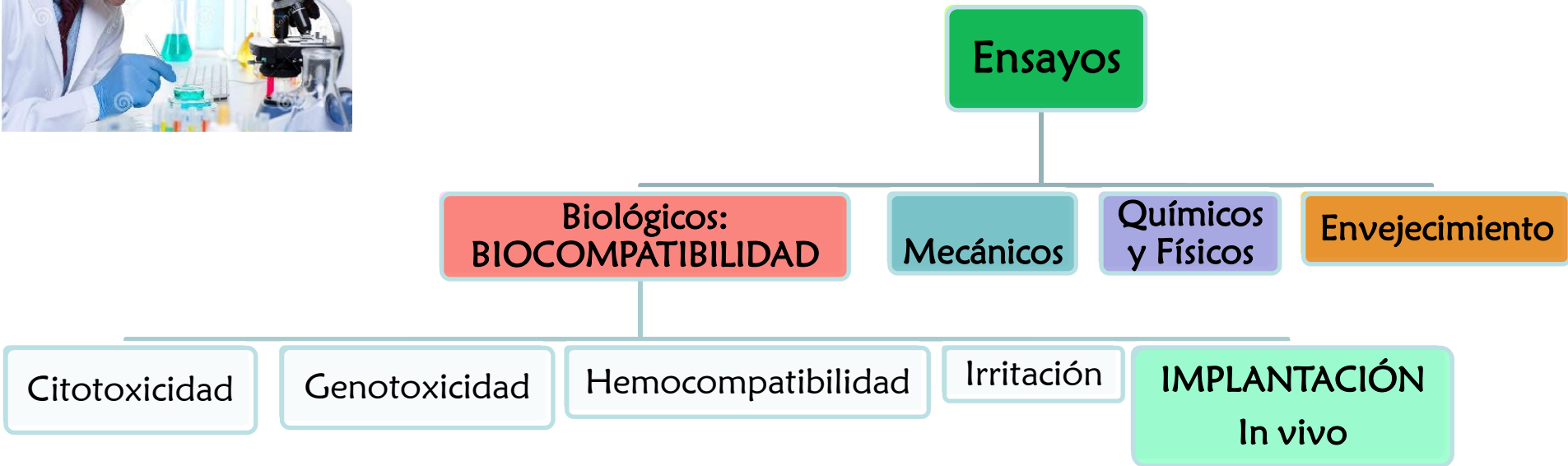
“Para lograr la certificación del PM y la de la empresa fabricante, se deben llevar a cabo todos los tipos de ensayos que resultaren aplicables, emitidos por Lab. oficiales o privados acreditados por el OAA”.



Disposiciones a tener en cuenta:

- **Disp. 2318/02:** Registro de PM
- **Disp. 2303/14:** Sistema de Trazabilidad de PM
- **Disp. 3266/13:** BPF

Ensayos sobre dispositivos médicos implantables



Pruebas Biológicas - Implantación

ISO 10993

Biological evaluation of medical devices, 1991

Parte 1

Evaluation and testing within a risk management process

- **MATRIZ DE SELECCIÓN DE ENSAYOS**

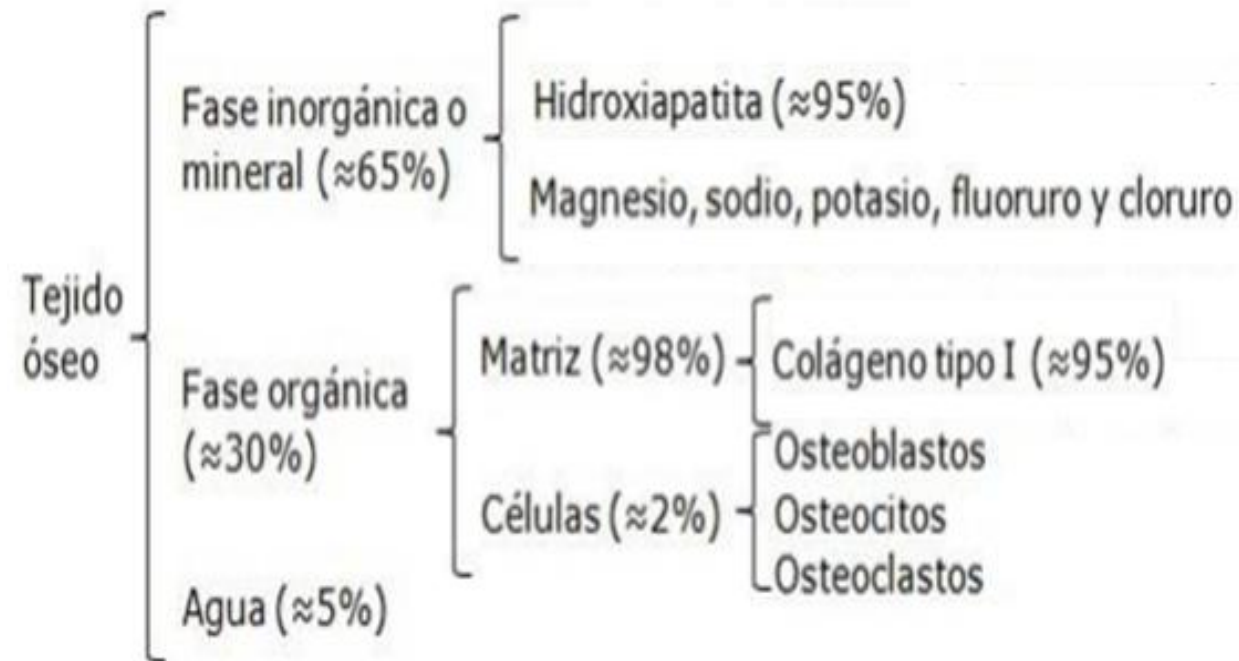
Parte 6

Tests for local effects after implantation

- Ensayo de implantación.

DEVICE CATEGORIES			BIOLOGICAL EFFECT												
BODY CONTACT		CONTACT DURATION A = Limited (<_24Hours) B = Prolonged (24 Hours - 30 Days) C = Permanent (>30 Days)	Cytotoxicity	Sensitization	Irritation/Intracutaneous	Acute Systemic Toxicity	Subchronic Toxicity	Genotoxicity	Implantation	Hemocompatibility	Chronic Toxicity	Carcinogenicity	Reproductive/Developmental	Biodegradation	
SURFACE DEVICES	Skin	A	x	x	x										
		B	x	x	x										
		C	x	x	x										
	Mucosal Membrane	A	x	x	x										
		B	x	x	x	o	o		o						
		C	x	x	x	o	x	x	o		o				
	Breached or Compromised Surfaces	A	x	x	x	o									
		B	x	x	x	o	o		o						
		C	x	x	x	o	x	x	o		o				
EXTERNALLY COMMUNICATING DEVICES	Blood Path, Indirect	A	x	x	x	x					x				
		B	x	x	x	x	o				x				
		C	x	x	o	x	x	x	o	x	o	o			
	Tissue/Bone/Dentin Communicating ¹	A	x	x	x	o									
		B	x	x	x	x	x	x	x						
		C	x	x	x	x	x	x	x		o	o			
	Circulating Blood	A	x	x	x	x		o ²			x				
		B	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
		C	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	o		
IMPLANT DEVICES	Tissue/Bone	A	x	x	x	o									
		B	x	x	x	x	x	x	x						
		C	x	x	x	x	x	x	x		o	o			
	Blood	A	x	x	x	x	x		x	x					
		B	x	x	x	x	x	x	x	x					
		C	x	x	x	x	x	x	x	x	o	o			

Tejido óseo



Reparación ósea

PRIMARIA

- ❖ Sin callo óseo.
- ❖ Contacto directo entre los fragmentos.



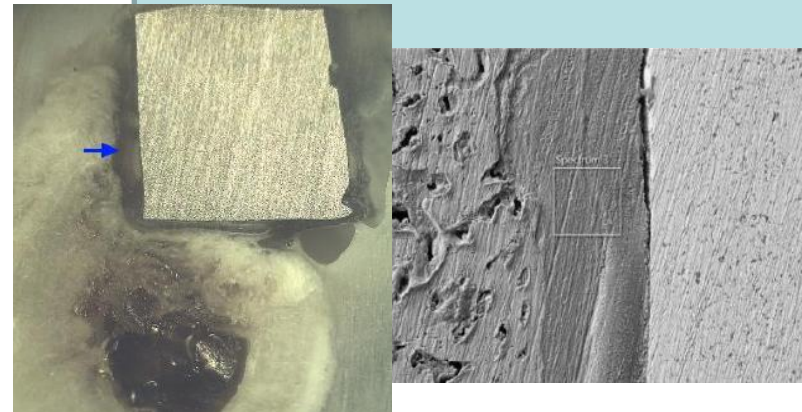
SECUNDARIA

- ❖ Con callo óseo.
- ❖ Fractura en posición con medios ortopédicos



FIBROINTEGRACIÓN

- ❖ Tejido fibroso entre hueso e implante.
- ❖ Material no biocompatible, inestabilidad del implante, cirugía traumática, falta de esterilización, etc.



Ti en la reparación y regeneración ósea

Titanio

BIOINERTE

BIOCOMPATIBLE:

OSTEOINTEGRACIÓN

Ti-Poroso:

- Asentamiento y fijación de osteoblastos.
- Aumento del BIC.

Mayor resistencia a la carga.

Ti-Hidroxiapatita:

- HA: Bioactivo
- HA-tejido: Biointegración.

Implantes de Ti (bioinerte con osteointegración) e HA (bioactivo con biointegración).

OBJETIVO GENERAL

Sistematizar el modelo experimental in vivo para evaluar biomateriales como reemplazo óseo diseñado en 2015. Para ello, encuadrar el procedimiento en el marco de regulación para PM nacionales y realizar los cambios pertinentes para su adaptación. Luego, ejecutar la implantación y evaluar desempeño y osteointegración en dos tipos de muestras: Ti-P y Ti-HA comparado con el Ti-D.

Objetivos Específicos

- Estudiar la implementación del modelo experimental y proponer mejoras en técnicas e instrumentación utilizadas en cada etapa.
- Diseñar y fabricar una matriz para la producción de implantes adaptados a las nuevas necesidades.
- Evaluar calidad de interfase hueso-implante mediante distintos métodos micro y macroscópicos



MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal - ISO 10993



Tamaño de las
muestras

Respuesta
biológica de los
tejidos



ANIMAL

Vida útil de los
animales

Duración de la
prueba



Elección de sujeto experimental

12 ratas - Bioterio de Cátedra de Fisiología Animal, FCEFYN

Cepa Wistar

Macho

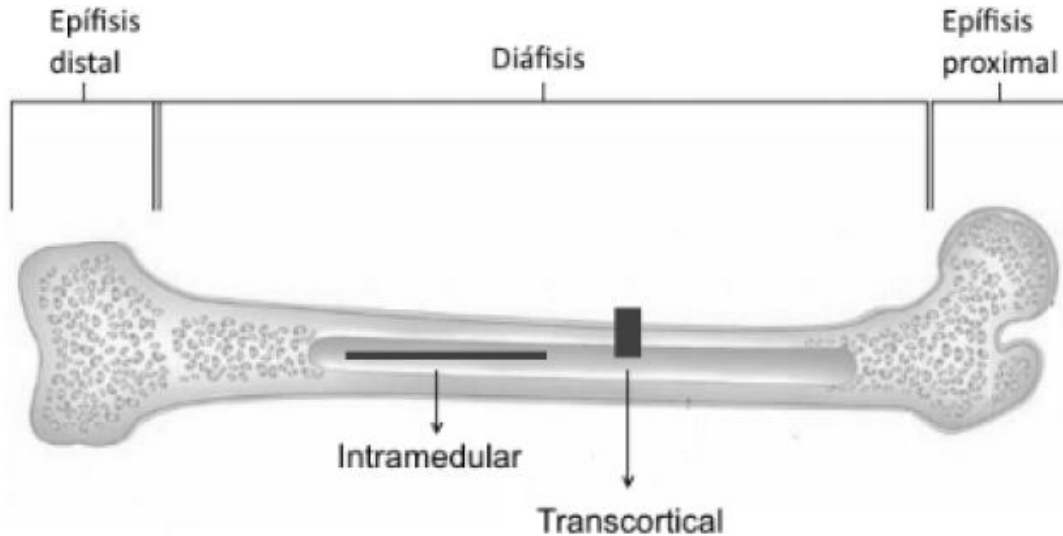
Ciclos de luz y
oscuridad de
12 hs

Clima de 22 °C

Agua y comida
ad libitum

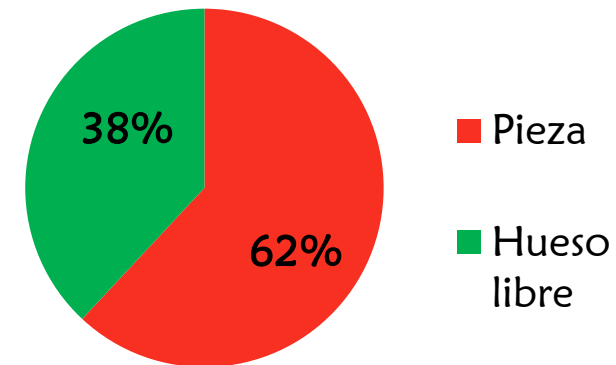


Sitio de Implantación



Piezas en PI anterior:
2,24mm Ø
2,41mm alto

	10 semanas	14 semanas
ϕ máx (diáfisis) [mm]	3,89 ± 0,05	4,08 ± 0,14
ϕ mín (diáfisis) [mm]	3,18 ± 0,11	3,33 ± 0,15



Diseño y fabricación de la matriz

PROPUESTAS:

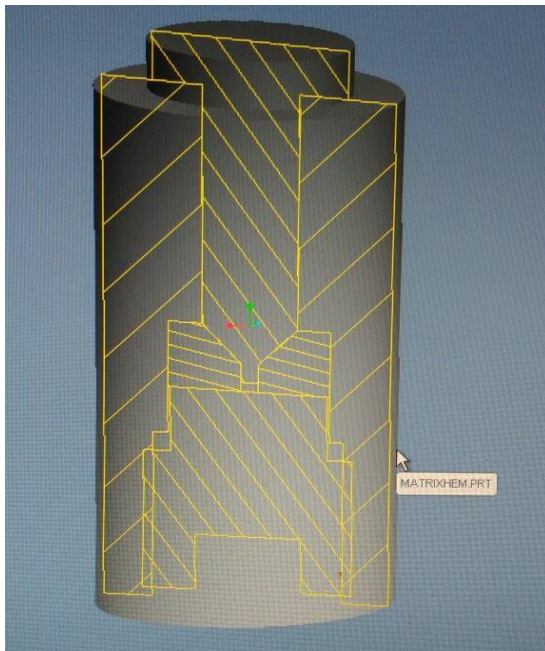
- Molde cilíndrico para pieza de 1,8 mm de alto,
- Material resistente a compresión
- Diseño que permita la realización de una pieza por vez
- Desmolde de la pieza sin utilizar elemento adicional luego de someterse a alta presión de compactación.

FABRICACIÓN

- Software utilizado
“PRO ENGINEER”

- Empresa de **José
M. Alladio e Hijos
S.A**

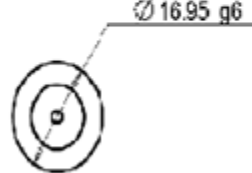
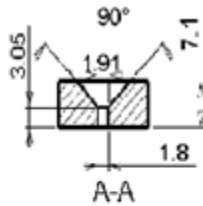
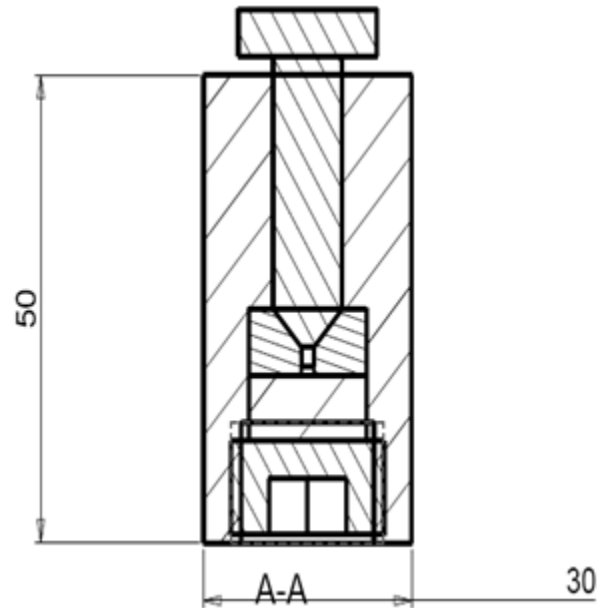
DISEÑO



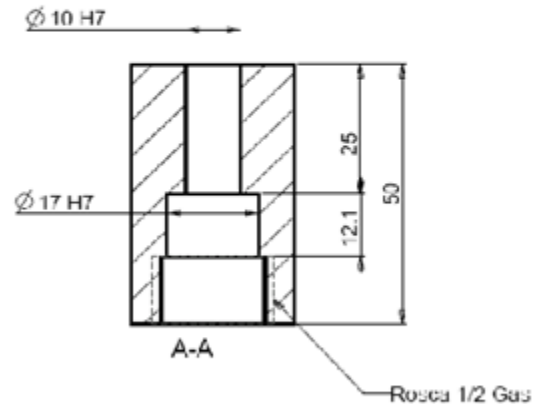
PARTES:
Porta matriz,
Vástago,
Hembra,
Disco de soporte,
Tapa de cierre



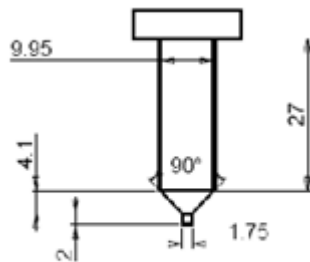
Planos la de matriz fabricada



Hembra



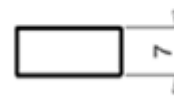
Porta Matriz



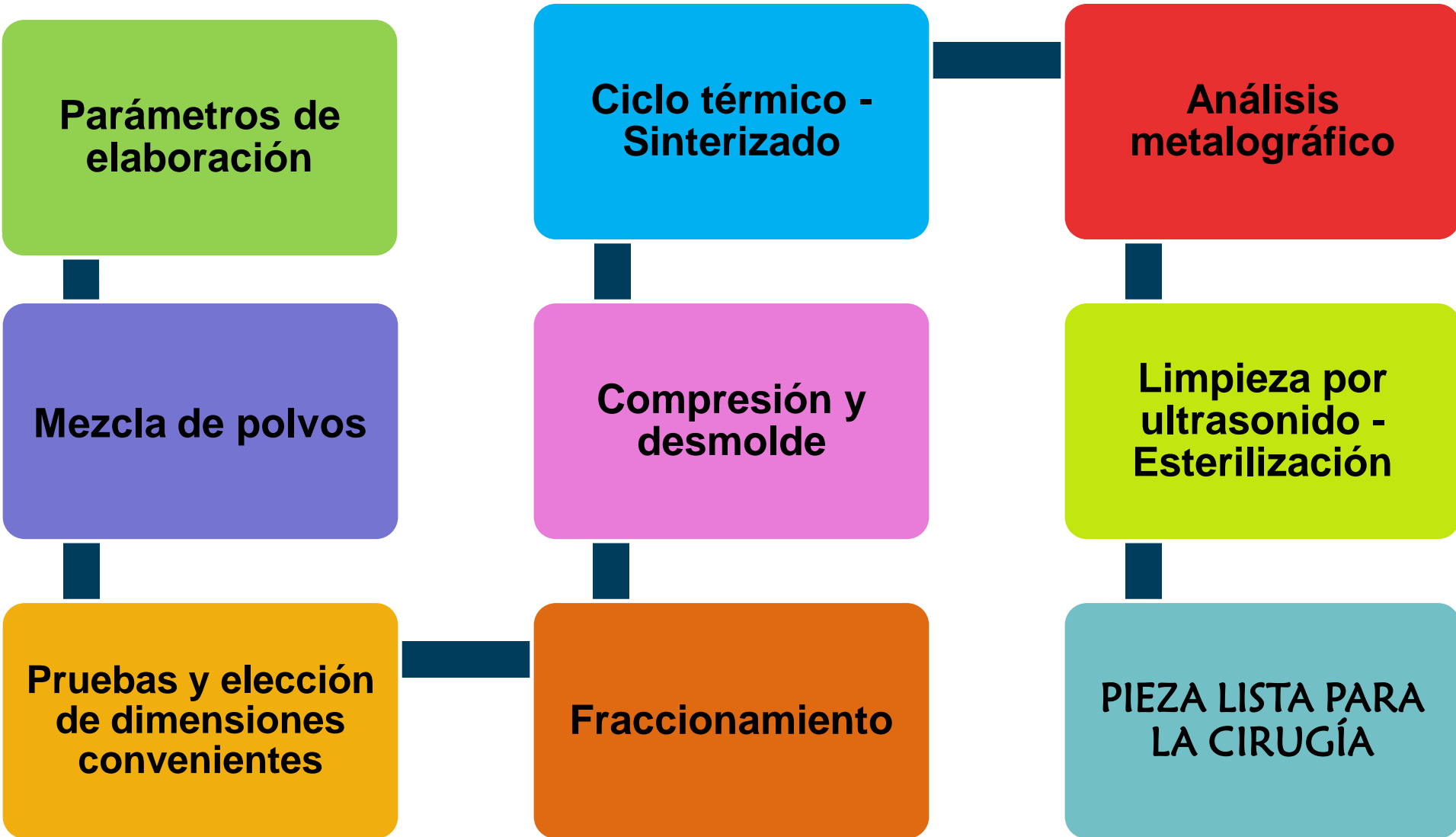
Vástago



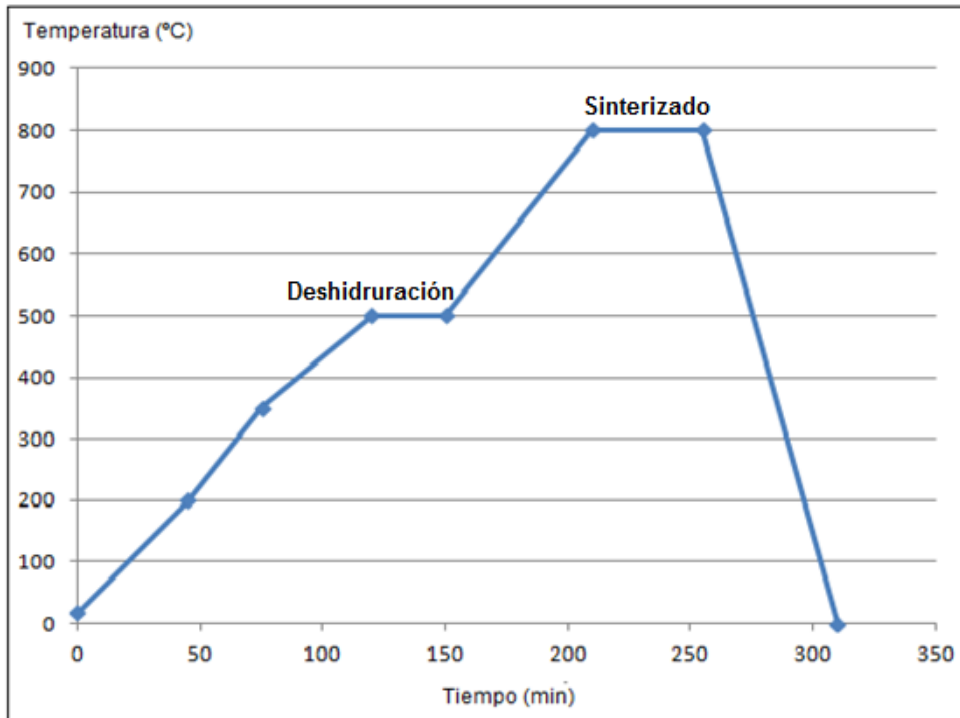
Disco



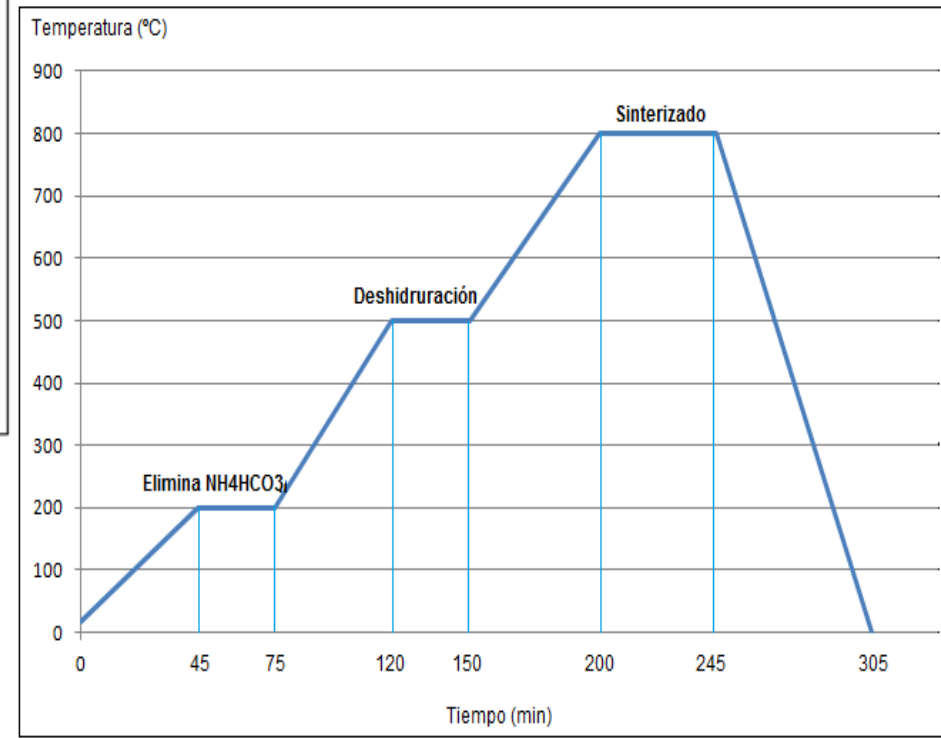
Fabricación de piezas



Ciclos térmicos



Ciclo térmico aplicado a piezas de Ti y de Ti-HA



Ciclo térmico aplicado a piezas de Ti-P

Prototipos de soportes



Canastilla de la cámara

1



Soporte de Acero Inoxidable

2



Vaina de cerámica con soporte de Acero

3

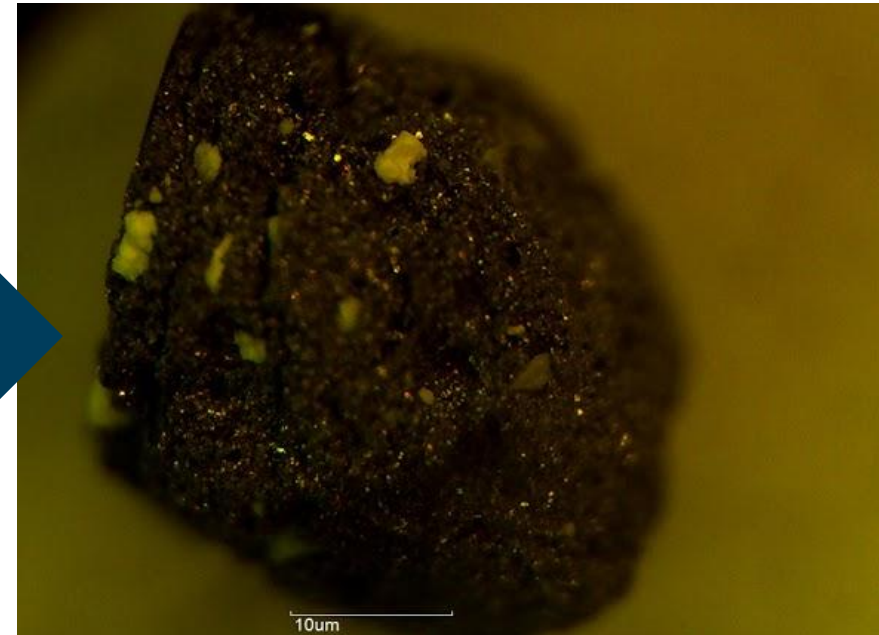


Estuches de cuarzo

Limpieza por ultrasonido y esterilización

- Agua destilada - 30 minutos
- Alcohol al 70 % - 30 minutos
- Esterilización a calor seco - 180 °C durante 30 minutos.

Pieza de Ti-HA desintegrada luego
del ultrasonido



Procedimiento quirúrgico

1

Prueba preliminar

- Determinación del \emptyset de la fresa.



2

Preparación de sujetos experimentales

- 11 sem de vida
- 12 patas izq: control
- 12 patas der: problema
- Pesaje y aclimatación 30 min antes de cirugía

3

Ambientación

- Laboratorio de Fisiología Animal, FCEFyN
- Calefacción 28 °C



Procedimiento quirúrgico

4

Anestesia

Hidrato de Cloral al 6%
Intraperitoneal
5 min: Ausencia de reflejos



5

Cirugía

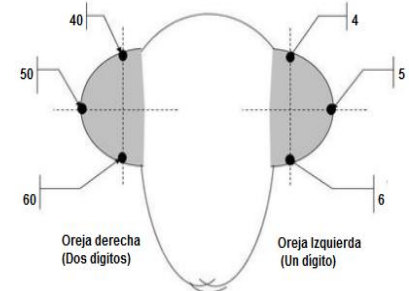
Incisión,
Acceso por cara anterolateral del muslo,
Separación de músculos Bíceps femoral y Glúteo
Exposición del fémur
Trepanación
Implantación
Sutura



6

Identificación de animales

-Cortes sobre orejas según método de Lab. de Fisiología Animal.
-Analgésico



Procedimiento quirúrgico

7

Seguimiento postoperatorio mediato e inmediato

Inmediato: 45 min calefacción directa

4 sem de experimentación

Mediato: peso, cant de agua y comida ingerida, pelaje, andar y apoyo de las patas.



8

Sacrificio

- 4 sem posteriores a las cirugías,
- Sobredosis de anestésico



9

Extracción de fémures

- Luego del sacrificio
- Extracción y limpieza



Análisis de resultados - Primera valoración

Análisis
Macroscópico

Radiografías

Análisis con
lupa
estereoscópica

-Borde radiolúcido
-Adherencia de la pieza
-Tipo de reparación ósea

Primera valoración de la
interfase hueso-implante

Preparado de muestras

Preparado de muestras



Muestra extraída



Fijación y
Deshidratación



Inclusión



Corte y pulido

Análisis de resultados-Microscopía electrónica

Análisis
microscópico

SEM -> BIC

EDS ->
Relación Ca/P

- Caracterización de interfase hueso-implante
- Observación de poros
- Cuantificación de la oseointegración

- Análisis elemental
- Calidad del hueso formado

Análisis de resultados - Estudios estadísticos

Análisis estadístico con valores de BIC

Diagrama de caja

Pruebas ANOVA y t p/ muestras apareadas

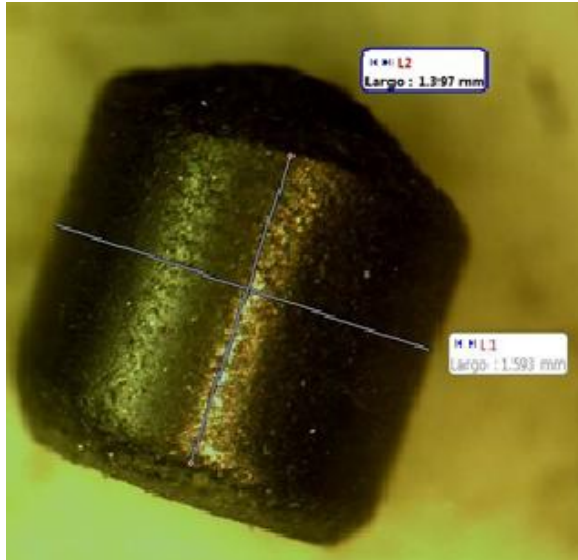
↓
Dispersión de valores

↓
Significancia estadística de resultados

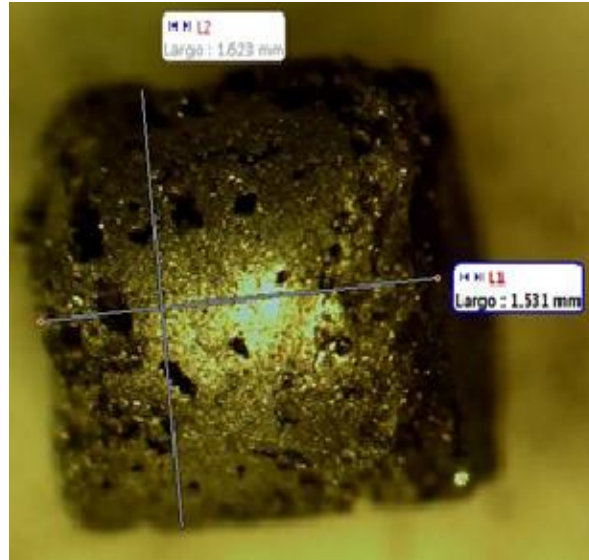
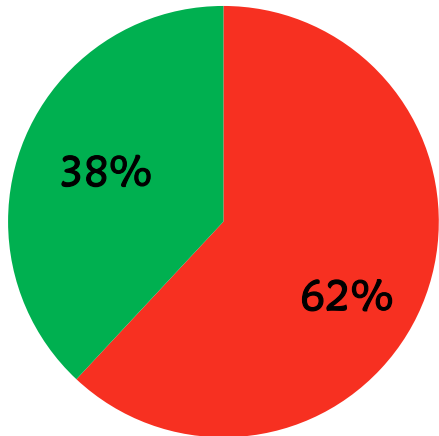


RESULTADOS

Piezas sinterizadas

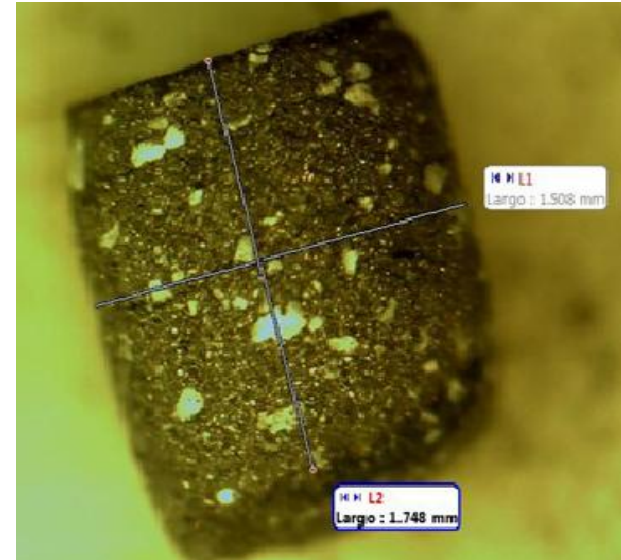


Ti-D

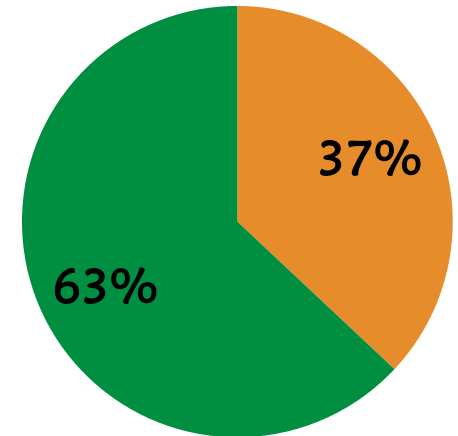


Ti-P

Medidas finales:
1,6 mm de \varnothing y 1,5 mm de alto.



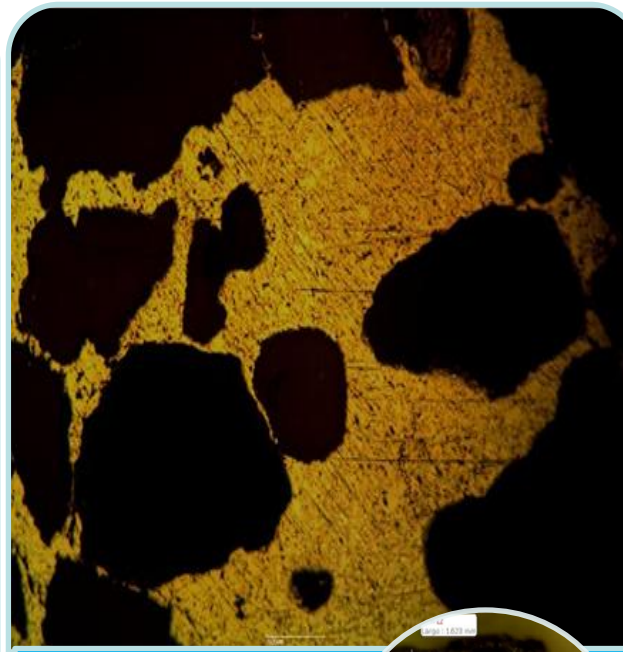
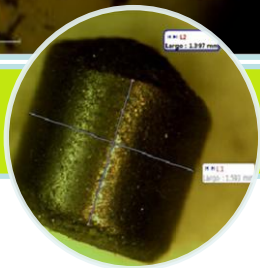
Ti-HA



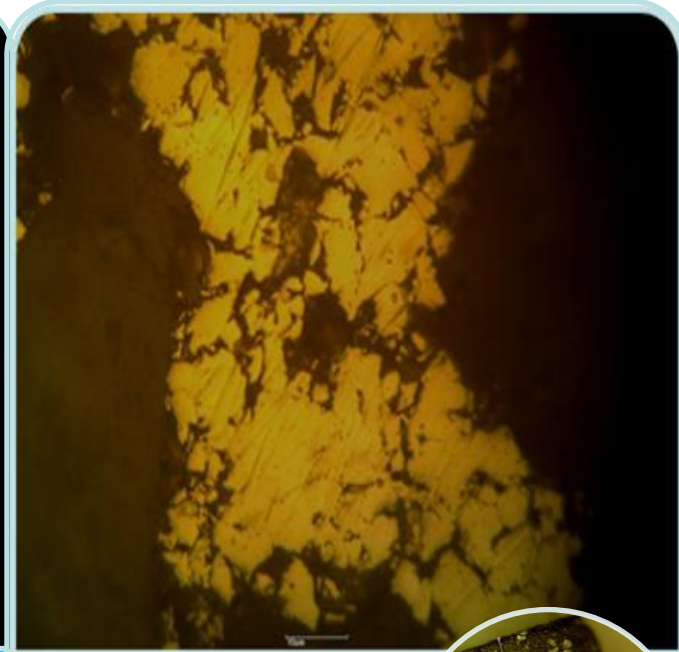
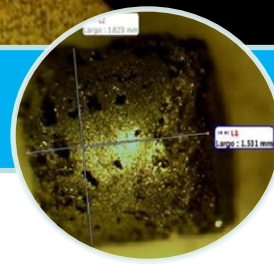
Metalografía



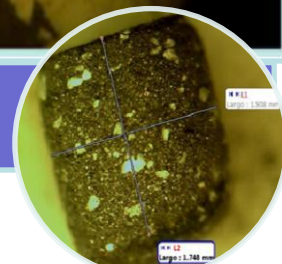
Ti-D



Ti-P



Ti-HA



Cirugía

RATA N°	EDAD	PESO (gr)	PATA IZQUIERDA	PATA DERECHA	ANESTESIA	OBS.
4	11	440	-	Ti-P	Hidrato de Cloral	
5	11	350	Ti	Ti-HA	Hidrato de Cloral	
6	11	380	Ti	2Ti-P	Hidrato de Cloral	Presión ejercida sobre pata derecha
40	11	410	Ti	Ti-HA	Hidrato de Cloral	Presión y más tiempo de cirugía.
44	11	370	2Ti	Ti-P	Hidrato de Cloral	
45	11	385	2Ti	Ti-HA	Hidrato de Cloral	Mayor presión sobre pata izquierda
46	11	344	Ti	Ti-P	Hidrato de Cloral	
50	11	403	Ti	Ti-HA	Hidrato de Cloral	
54	11	497	Ti	Ti-P	Hidrato de Cloral	Demora en cirugía
55	11	357	Ti	Ti-HA	Hidrato de Cloral	
56	11	442	Ti	2Ti-P	Hidrato de Cloral	
60	9	397	2Ti	Ti-HA	Hidrato de Cloral	

Resultados del post-operatorio

❖ 5 minutos/ 48 hs



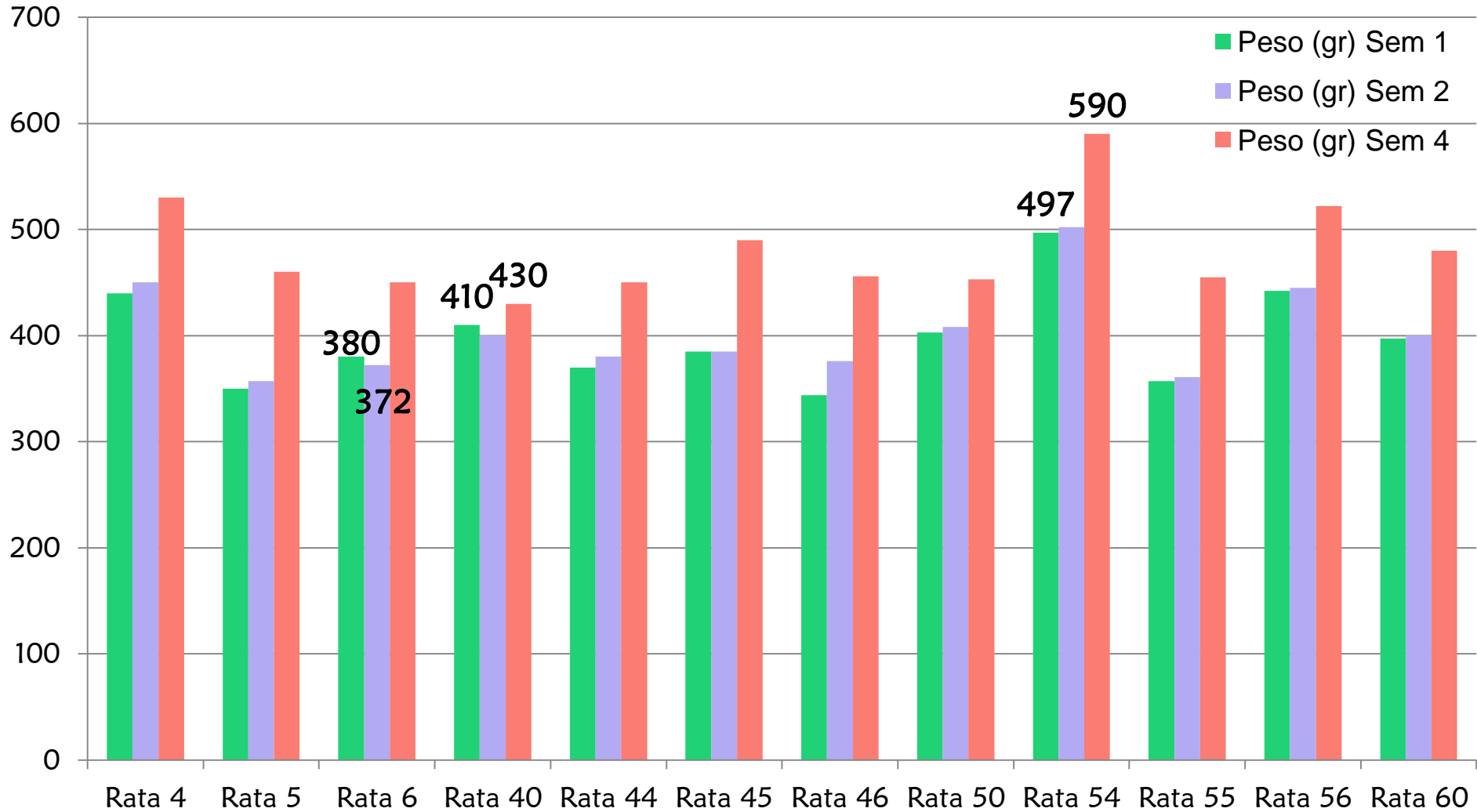
HIDRATACIÓN
Normal

INGESTA DE
ALIMENTO
Normal

PELAJE
Normal

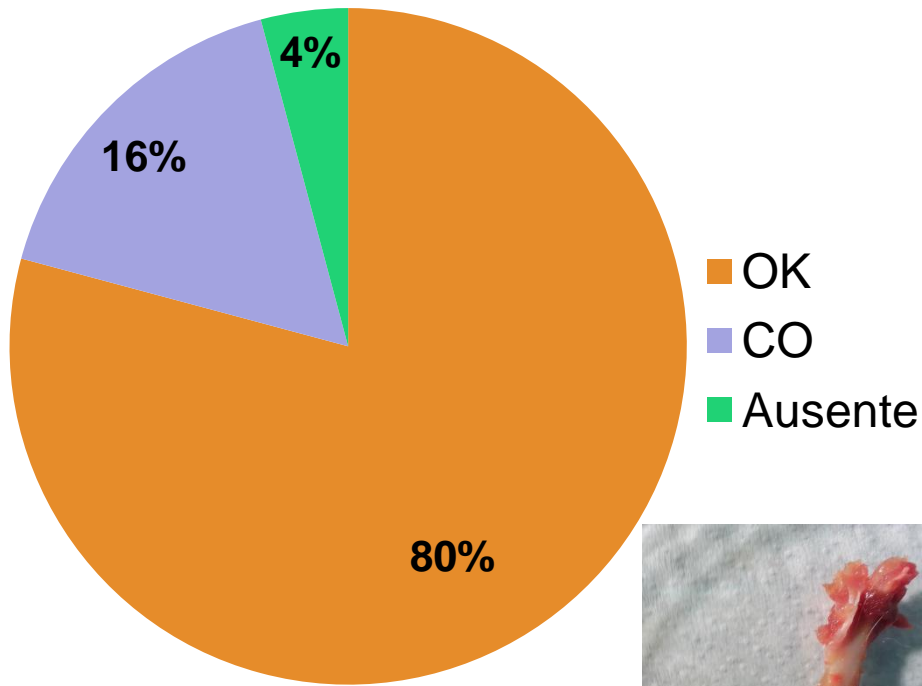
ANDAR
Dudoso en ratas
nº 40 y 45

Peso durante el post-operatorio

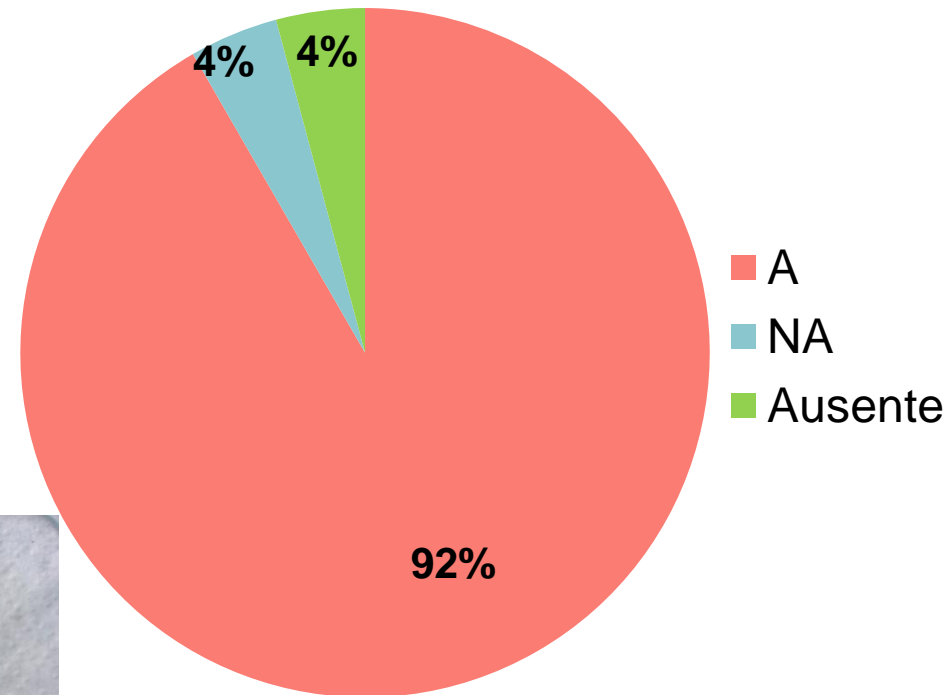


1º valoración de muestras extraídas

Reparación ósea



Adherencia



Placas Radiográficas



Muestras
fracturadas



Muestras con
piezas adheridas
a corteza y
médula



Muestras con
piezas en
corteza



Muestras con
piezas en
cavidad
medular

Análisis cualitativo de placas

Borde dudoso en ratas
nº 54 y 56

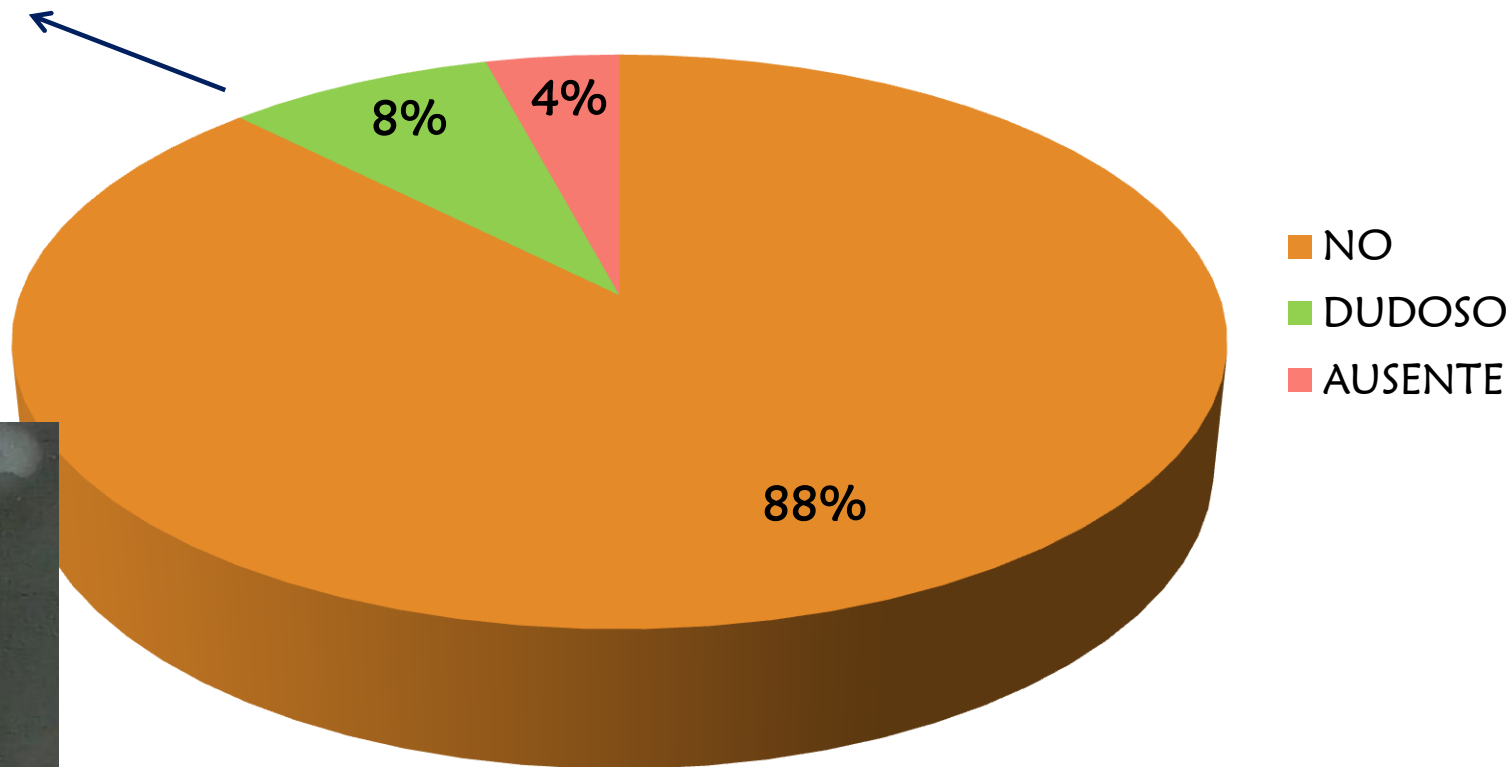
Borde Radiolúcido



54dP

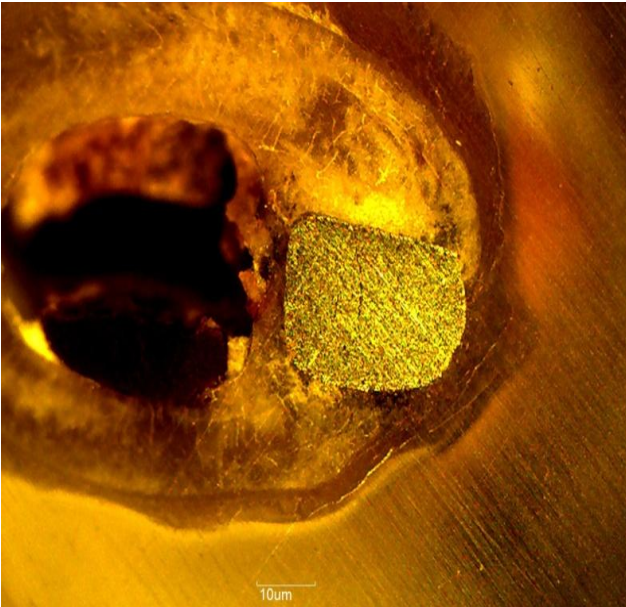


56dP

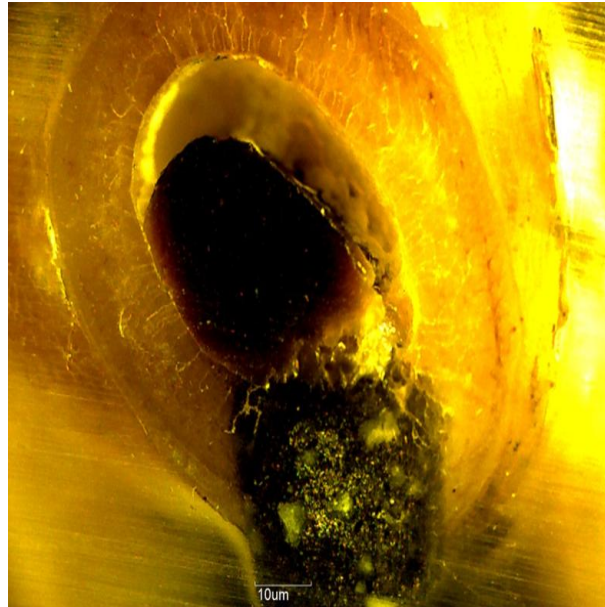


Reparación 2º solo en muestras fracturadas: 6d, 40i, 40d y 45d

Examen mediante Lupa estereoscópica



Muestra 5iD



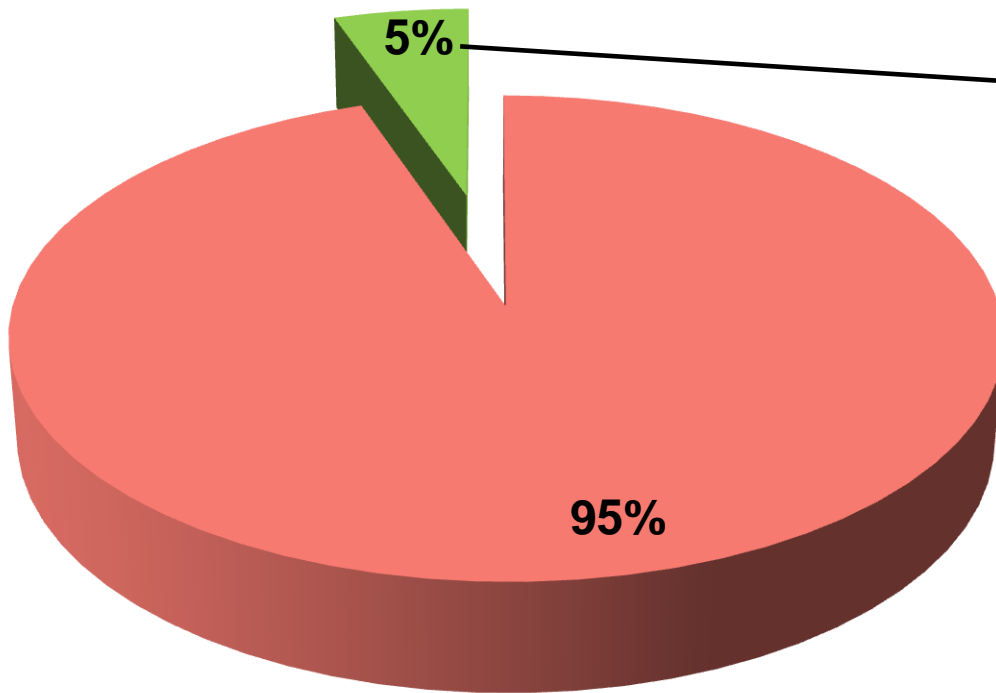
Muestra 5dHA



Muestra 46dP

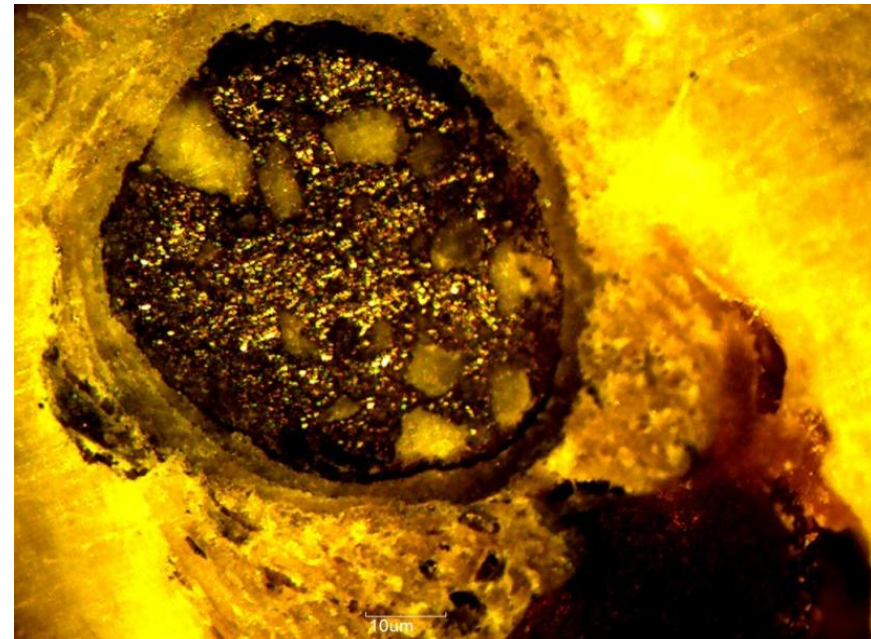
Examen mediante Lupa estereoscópica

Interfase hueso-implante



■ TO
■ DUDOSO

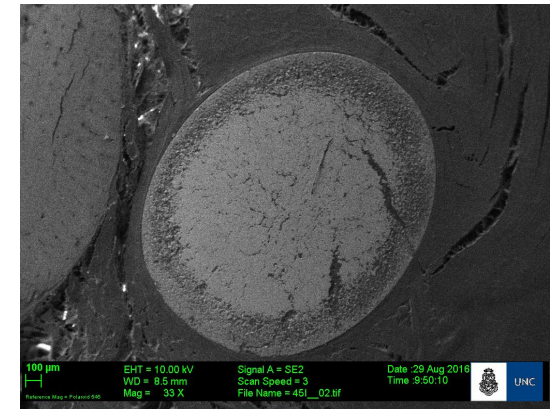
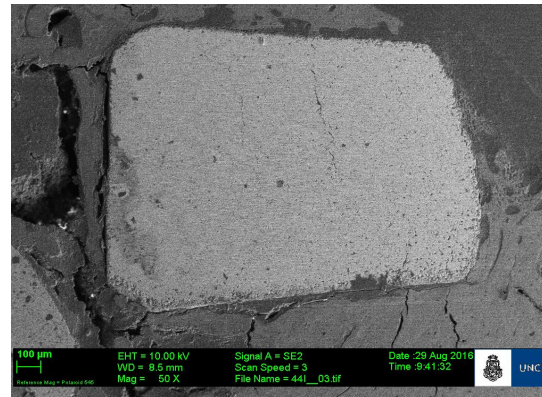
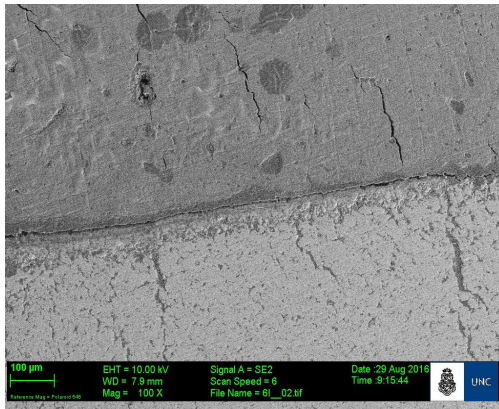
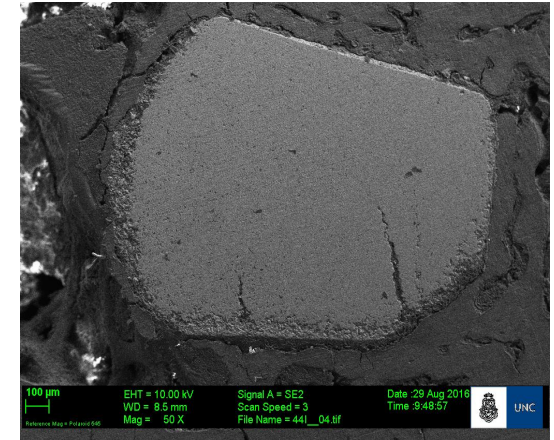
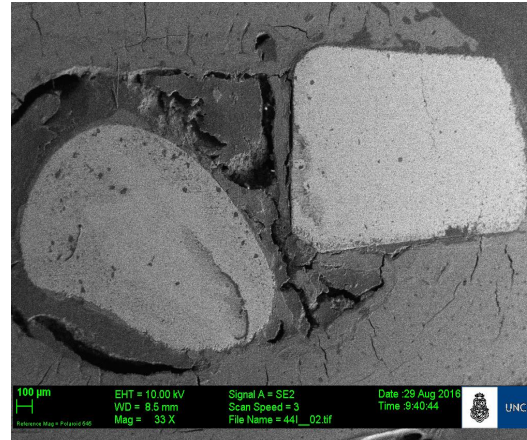
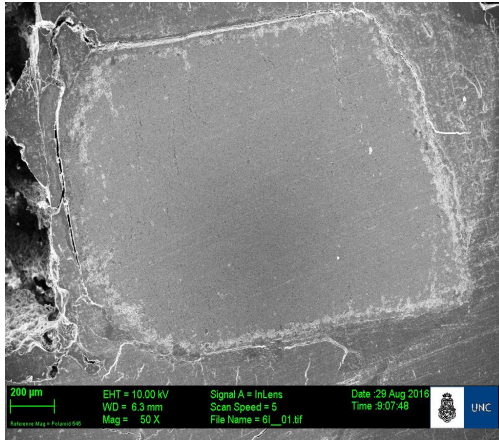
Muestra 60dHA



TO: tejido óseo
TF: tejido fibroso

Evaluación por imágenes BS-SEM

Ti-Denso



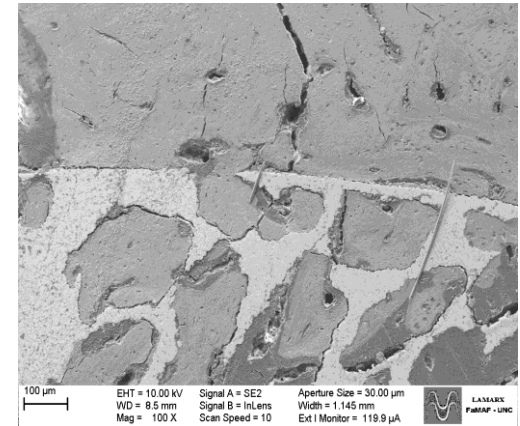
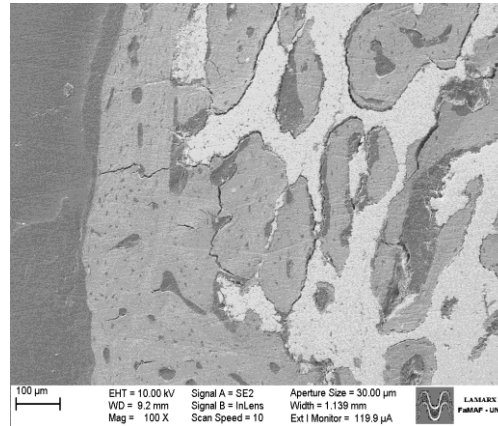
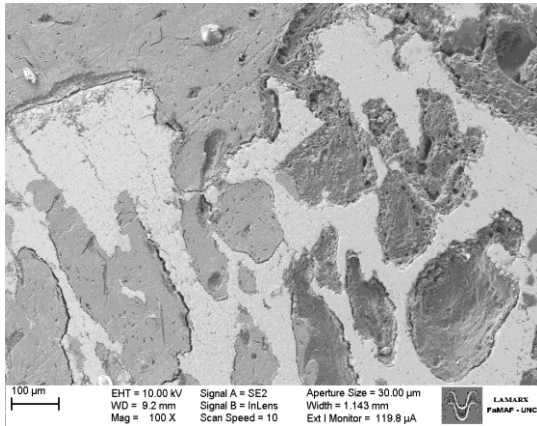
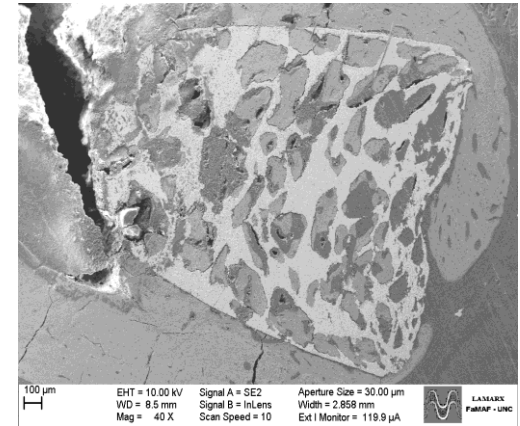
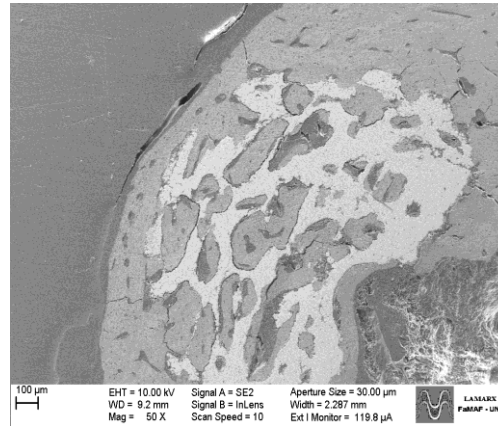
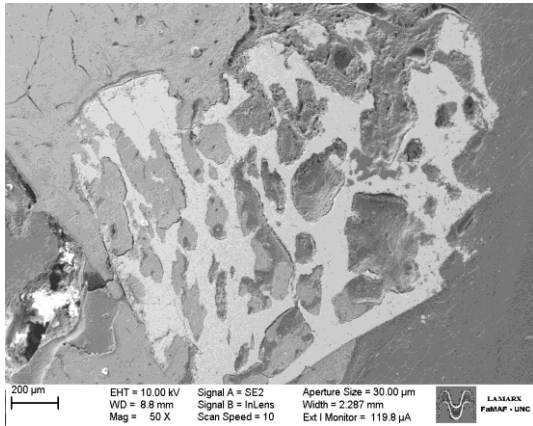
Muestra 5iD

Muestra 44iD

Muestra 45iD

Evaluación por imágenes BS-SEM

Ti-Poroso



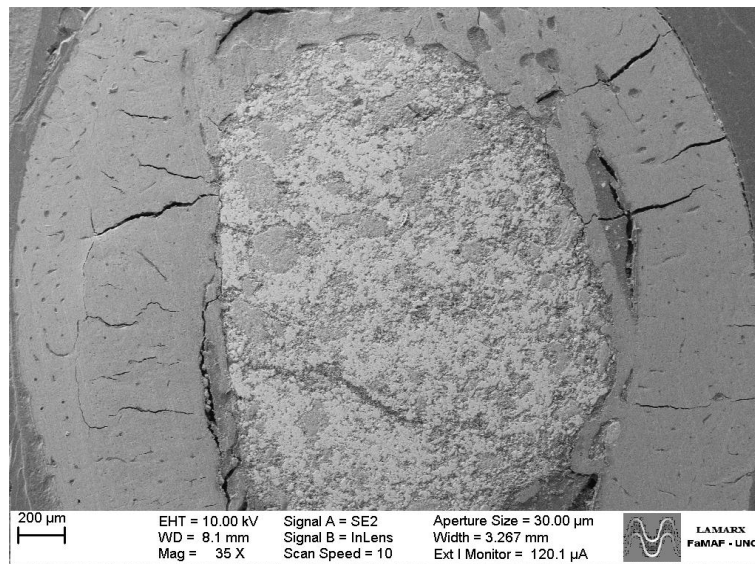
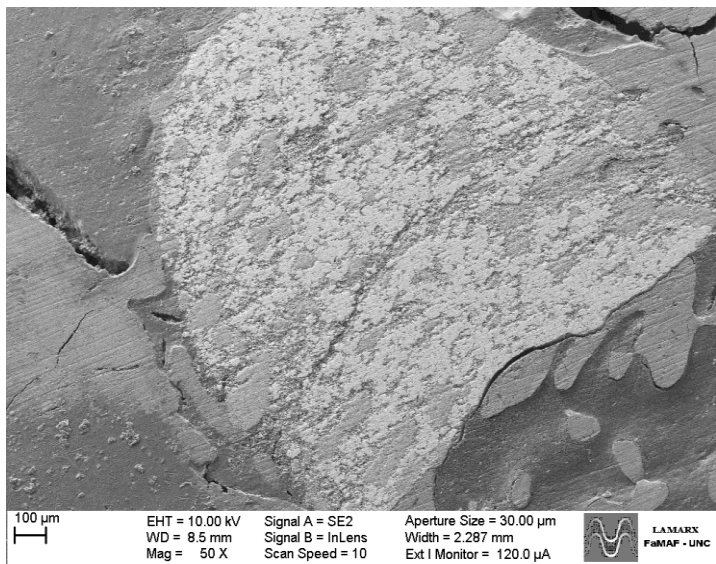
Muestra 4dP

Muestra 44dP

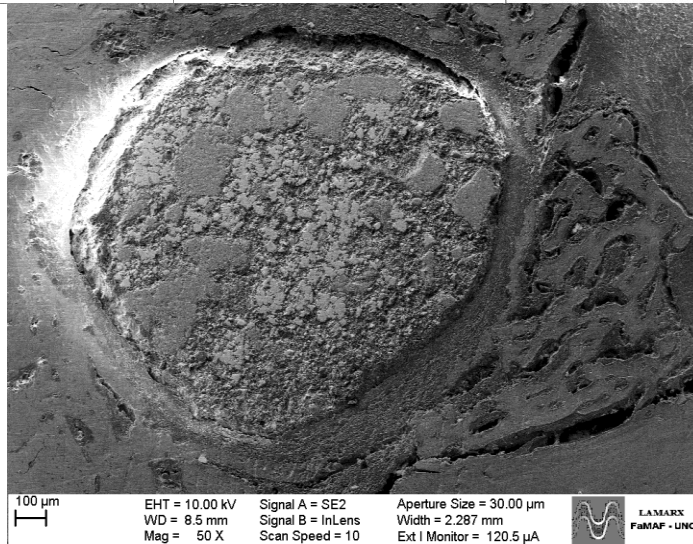
Muestra 46dP

Evaluación por imágenes BS-SEM

Ti-HA



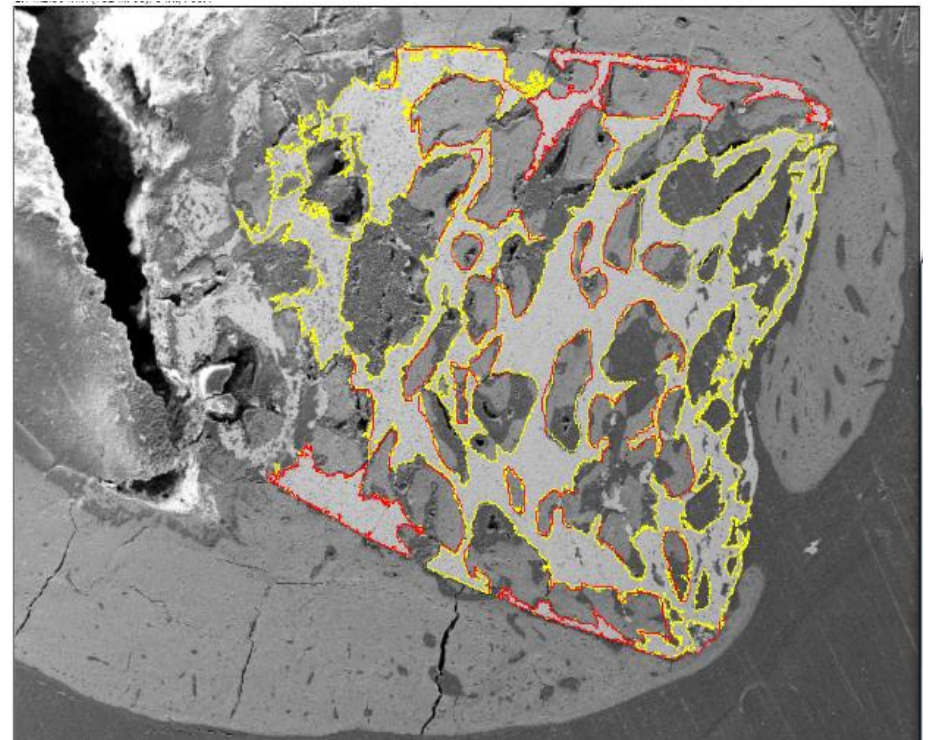
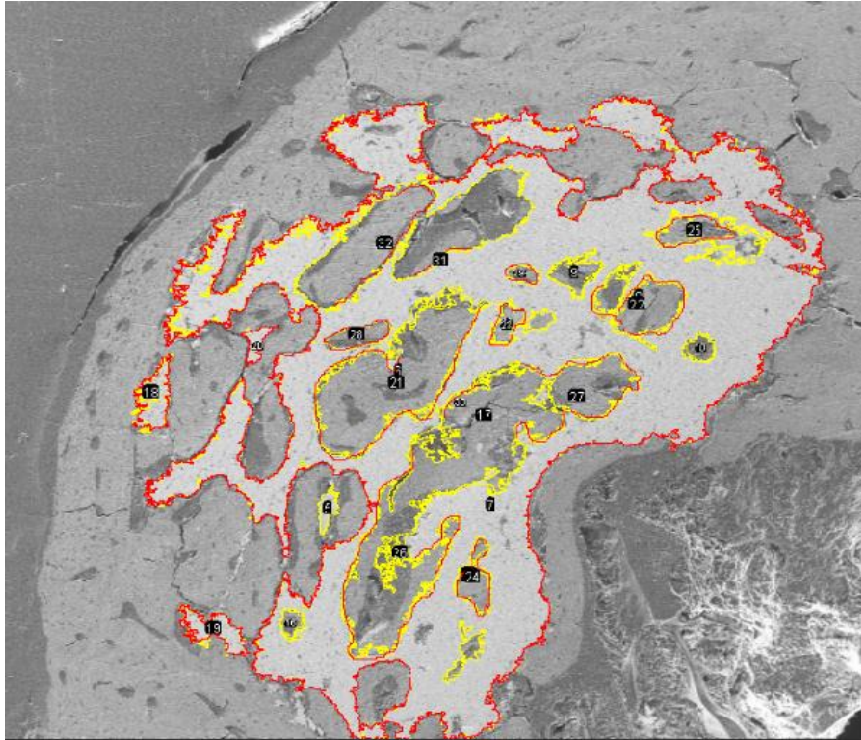
Muestra 50dHA



Muestra 55dHA

Muestra 60dHA

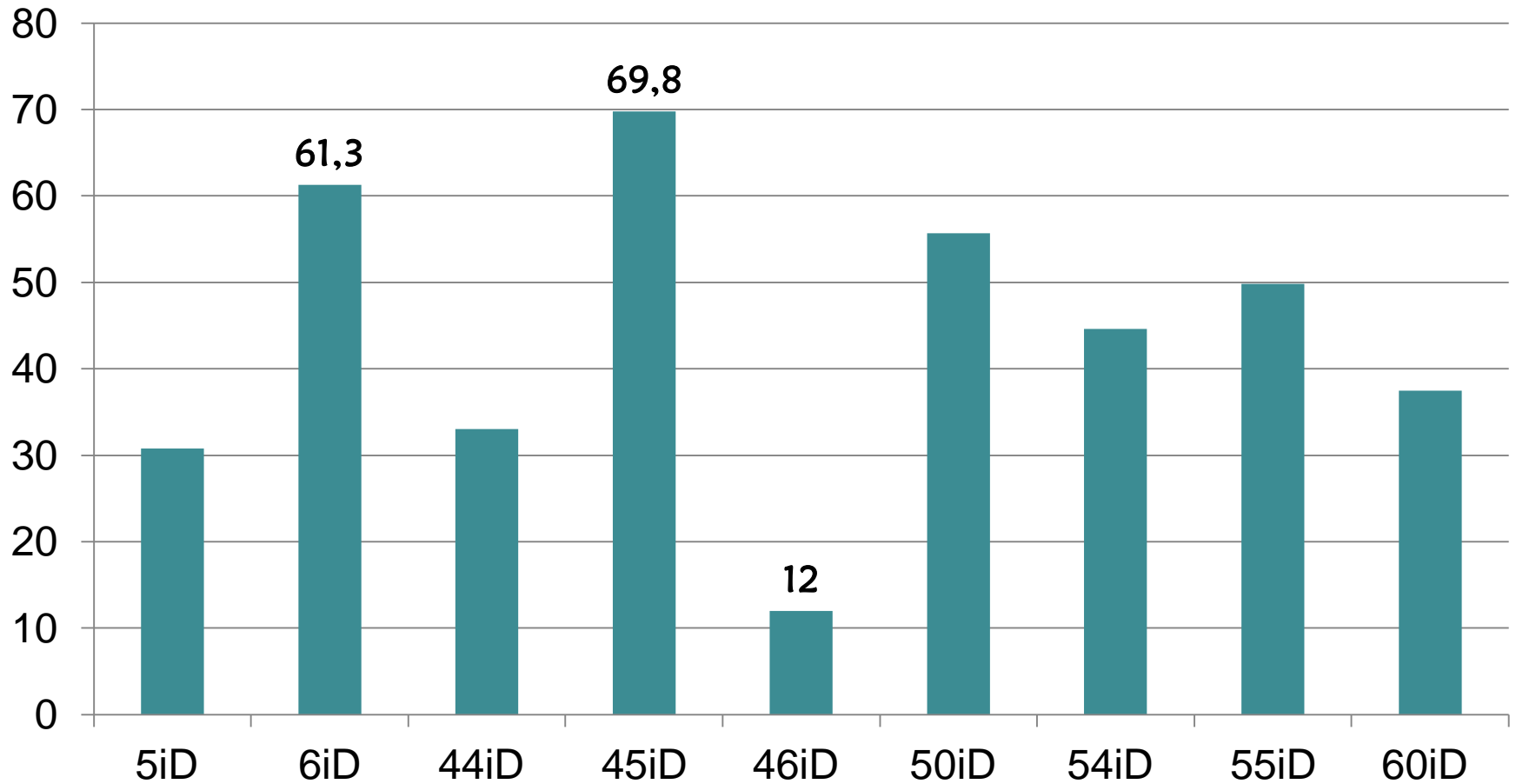
Cálculo de BIC



$$\%BIC = \frac{\text{Perímetro de implante en contacto con hueso}}{\text{Perímetro total del implante}} * 100$$

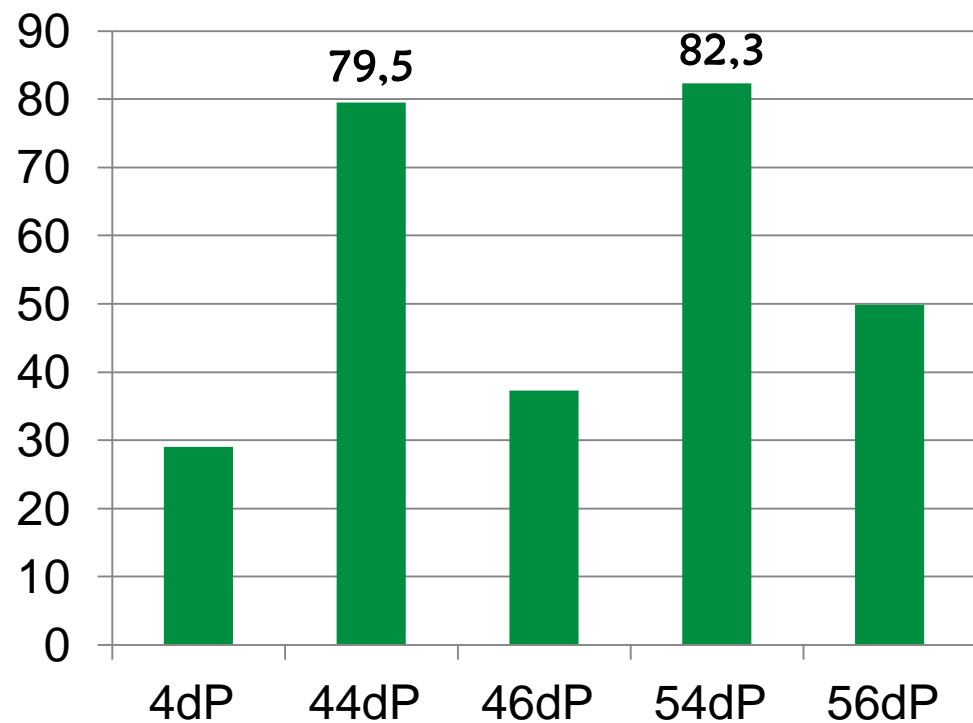
Cálculo de BIC

% BIC Ti-D

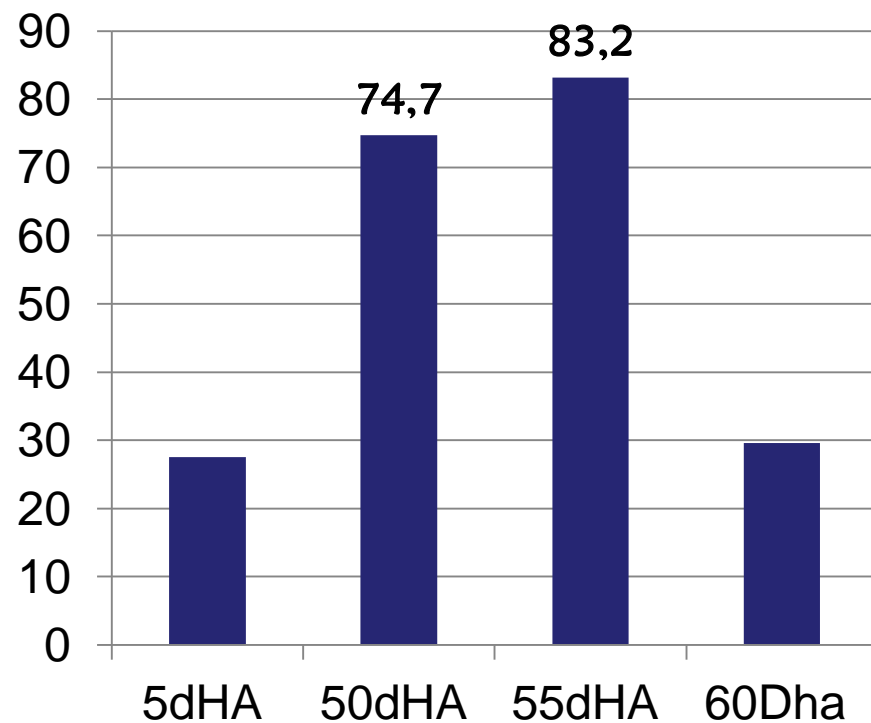


Cálculo de BIC

%BIC Ti-P

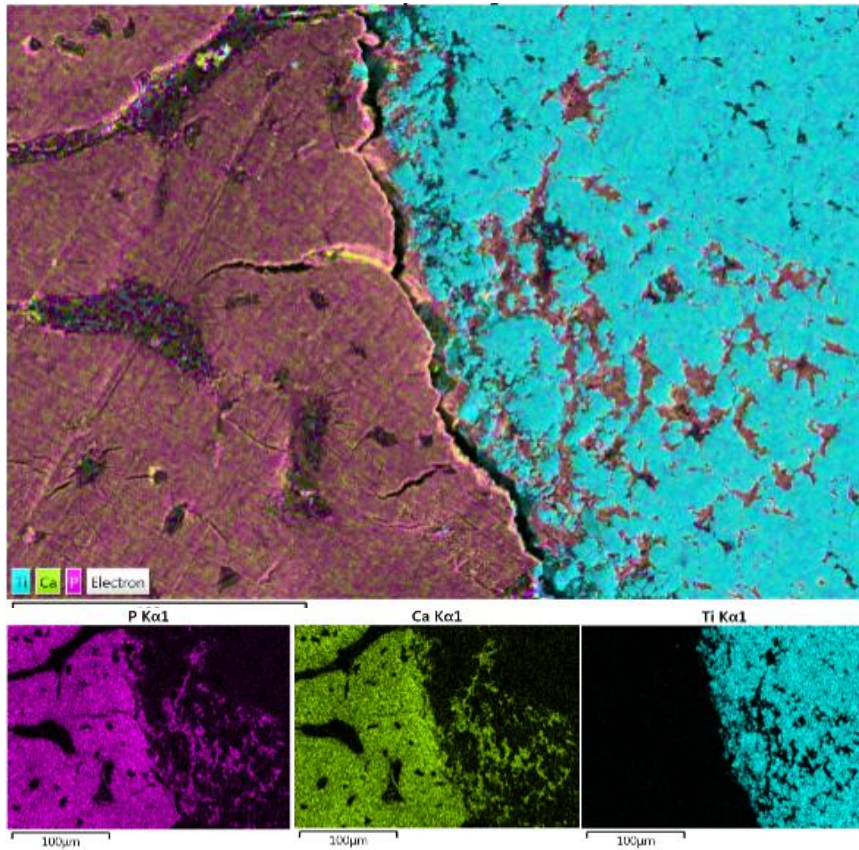


%BIC Ti-HA

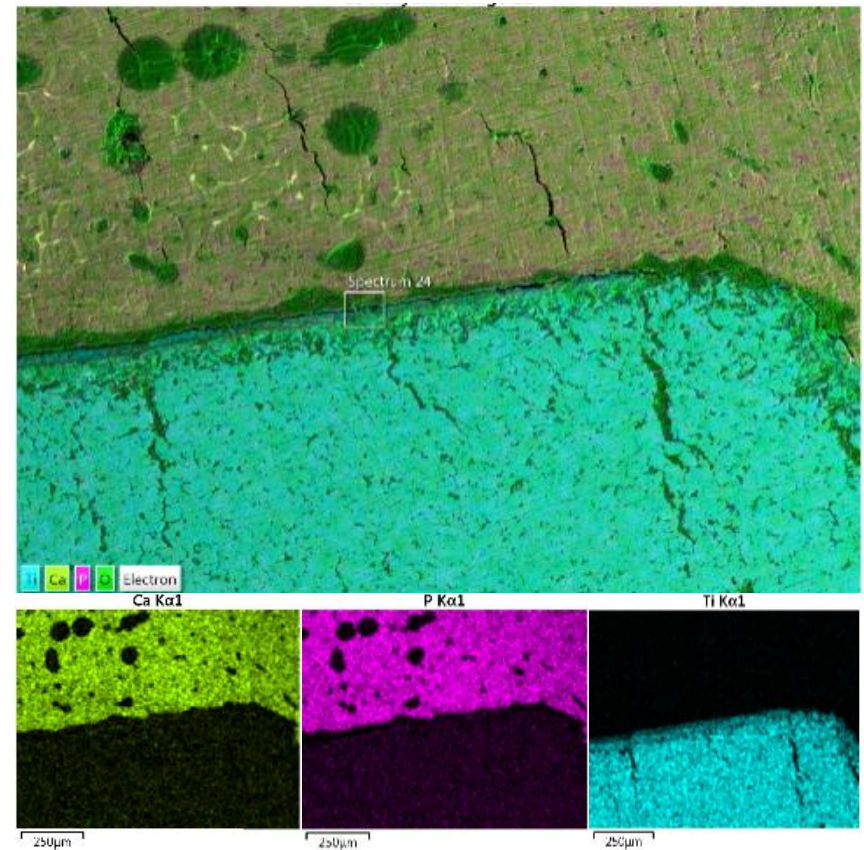


Análisis elemental - Imágenes EDS-SEM

Ti-Denso



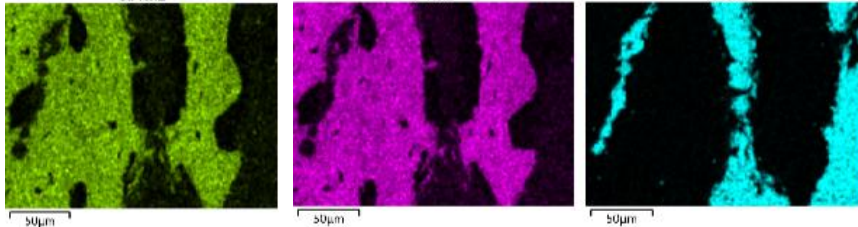
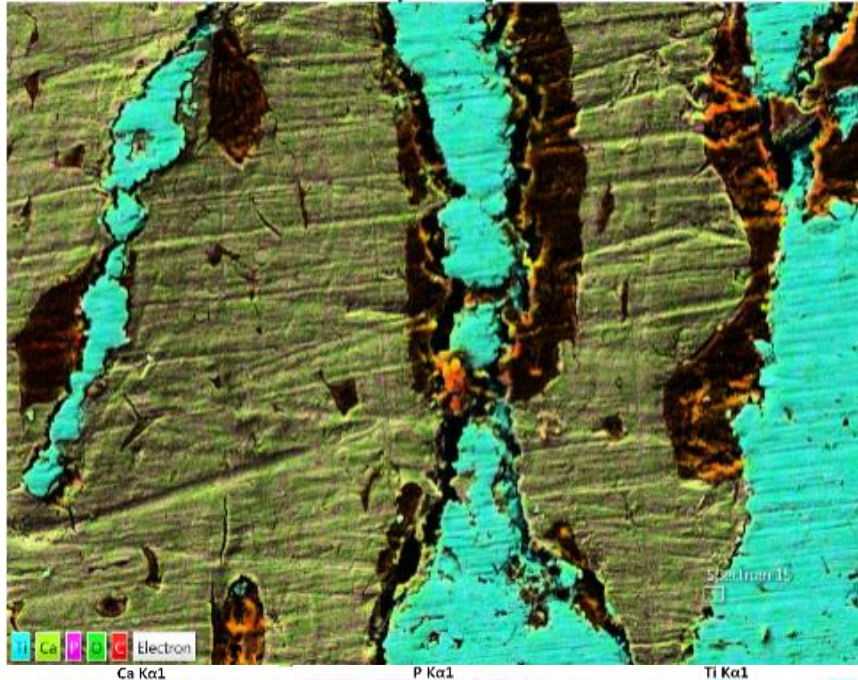
Muestra 5iD



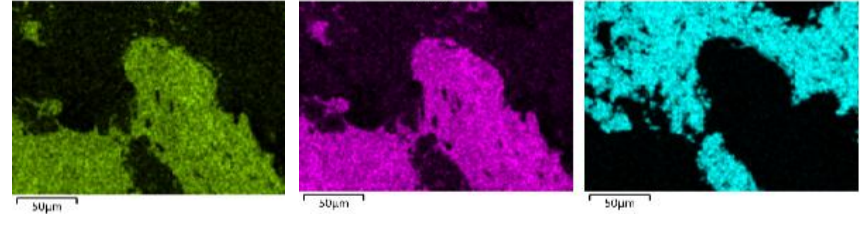
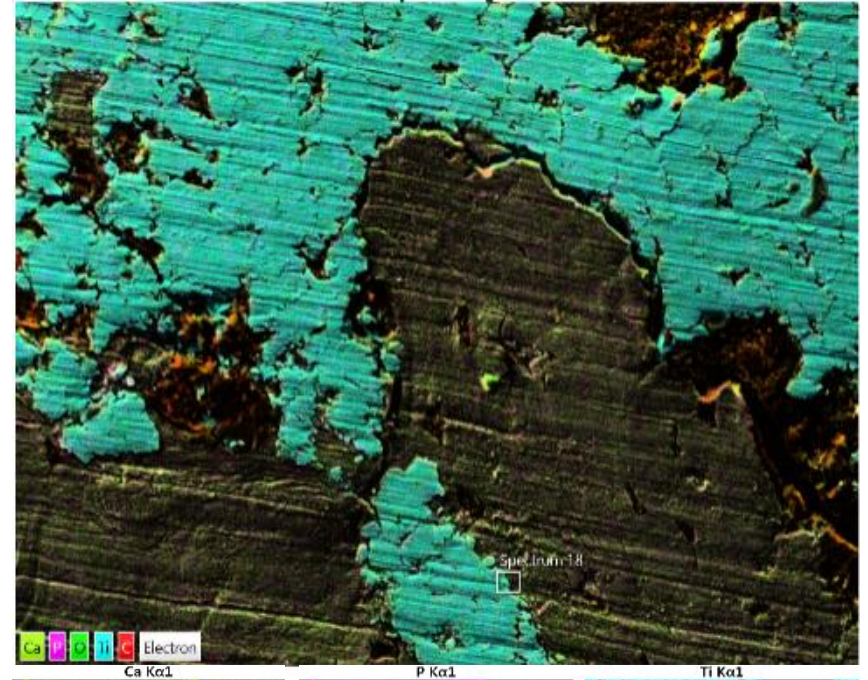
Muestra 6iD

Análisis elemental - Imágenes EDS-SEM

Ti-Poroso



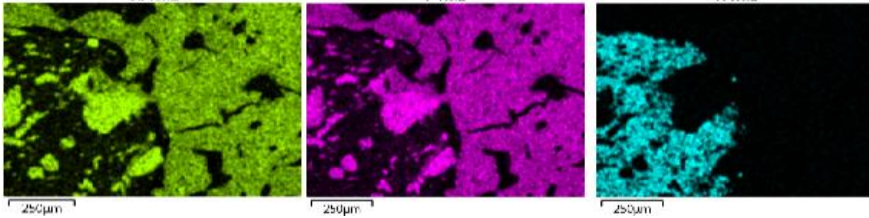
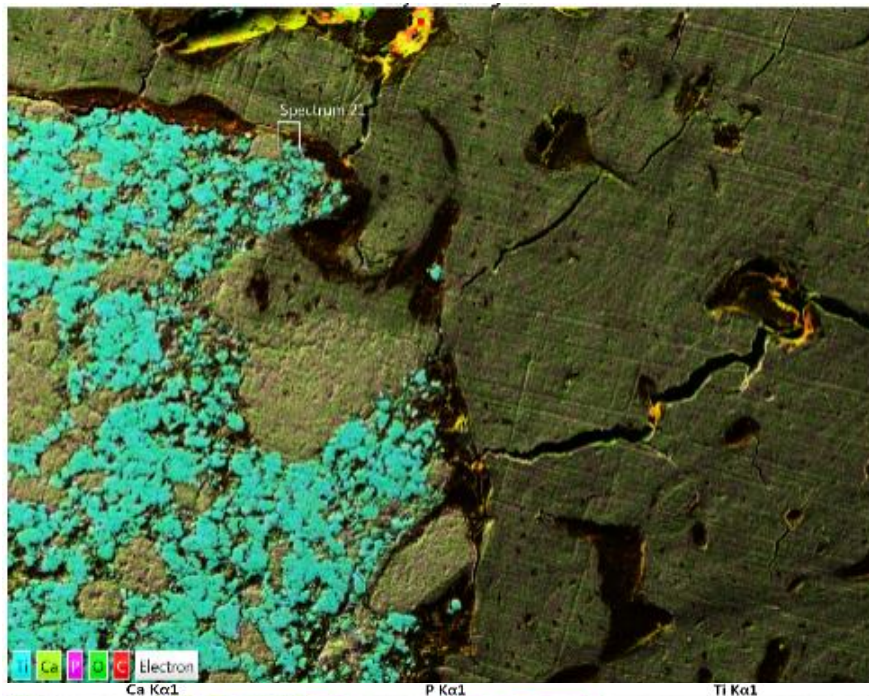
Muestra 44dP



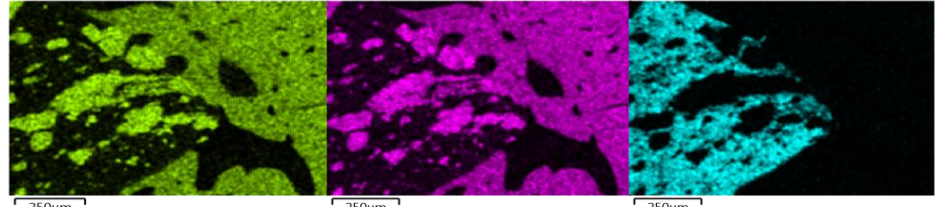
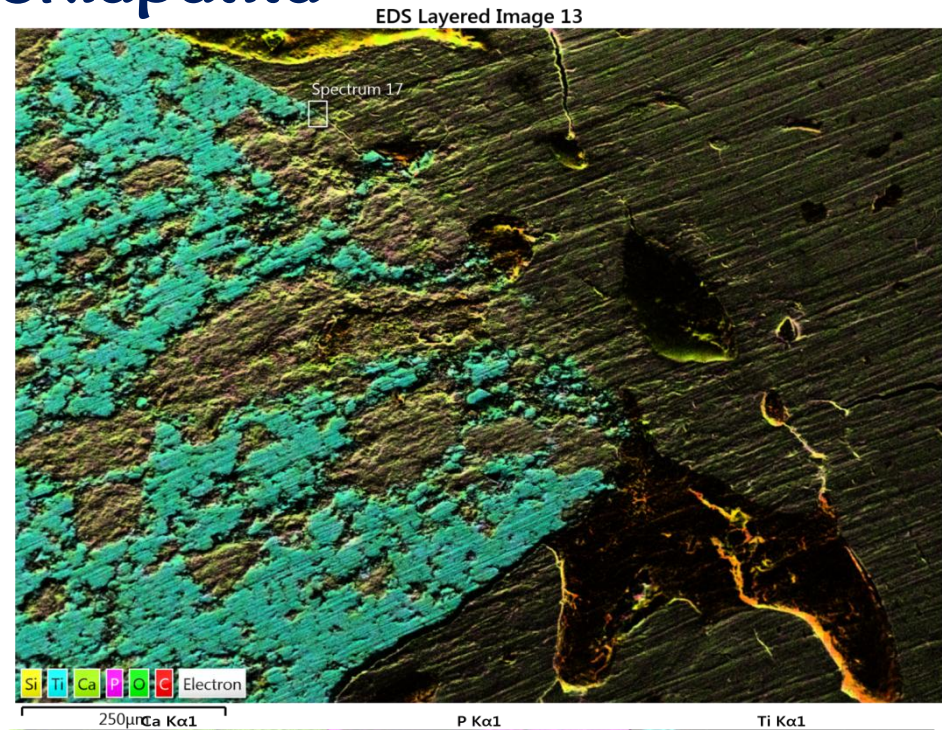
Muestra 54dP

Análisis elemental - Imágenes EDS-SEM

Ti-Hidroxiapatita

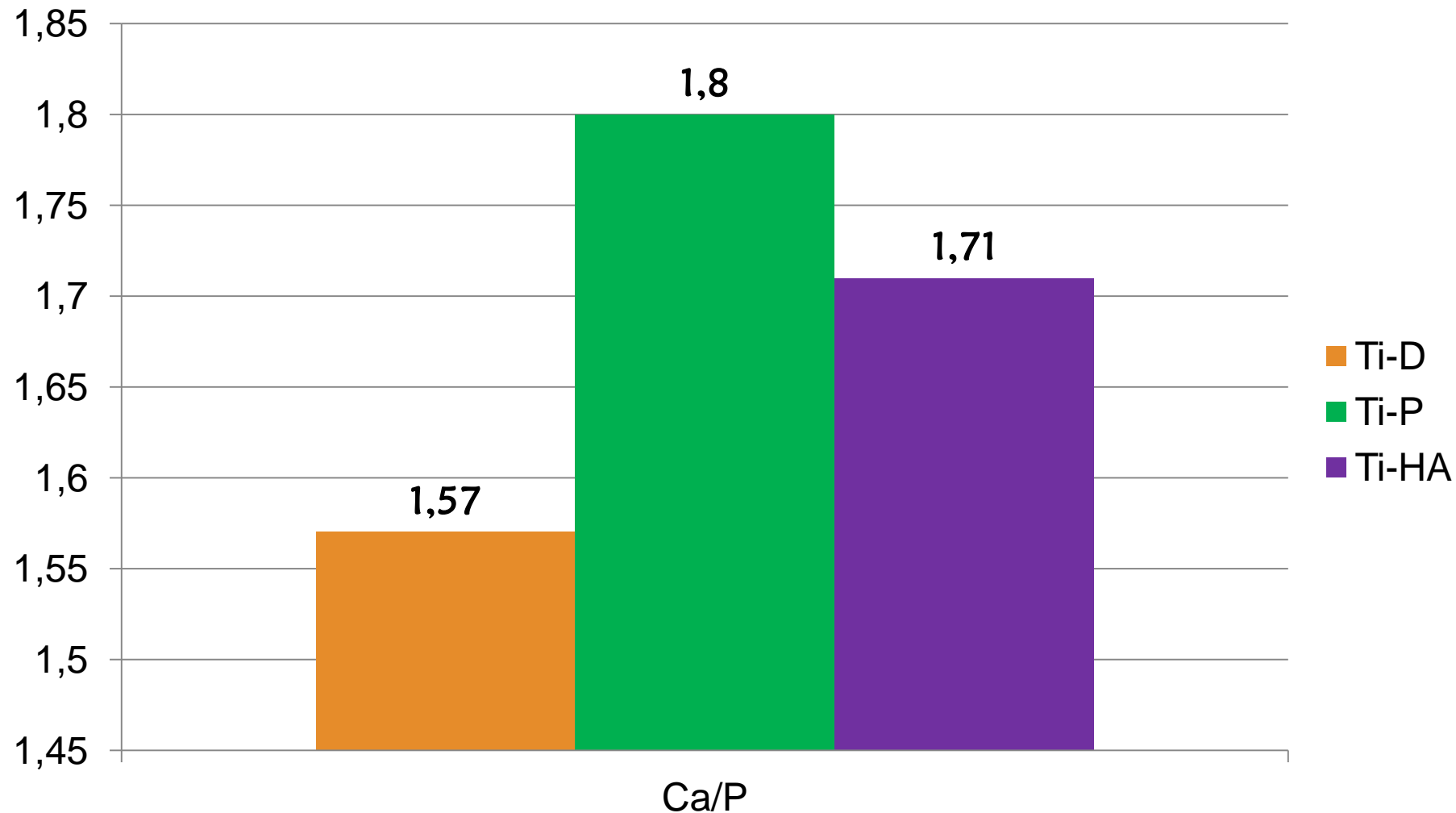


Muestra 5dHA



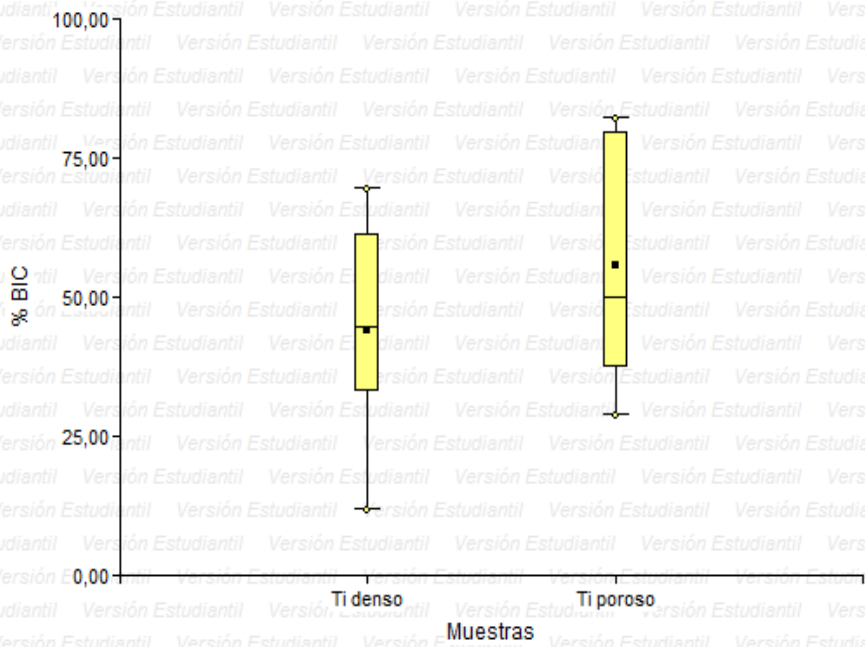
Muestra 50dHA

Relación Ca/P

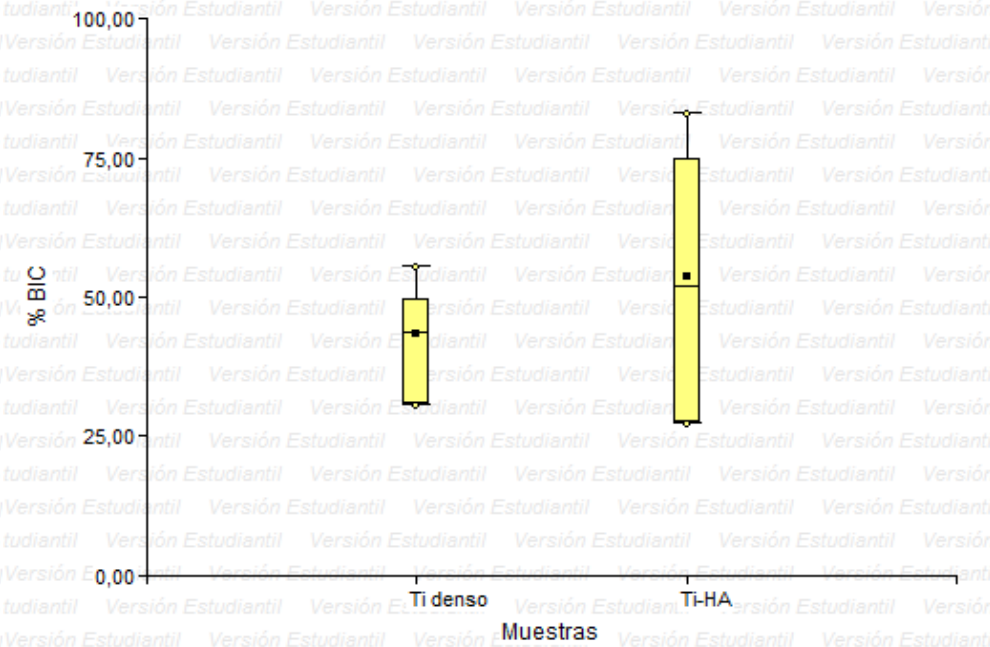


Estudio estadístico - Diagramas de Caja

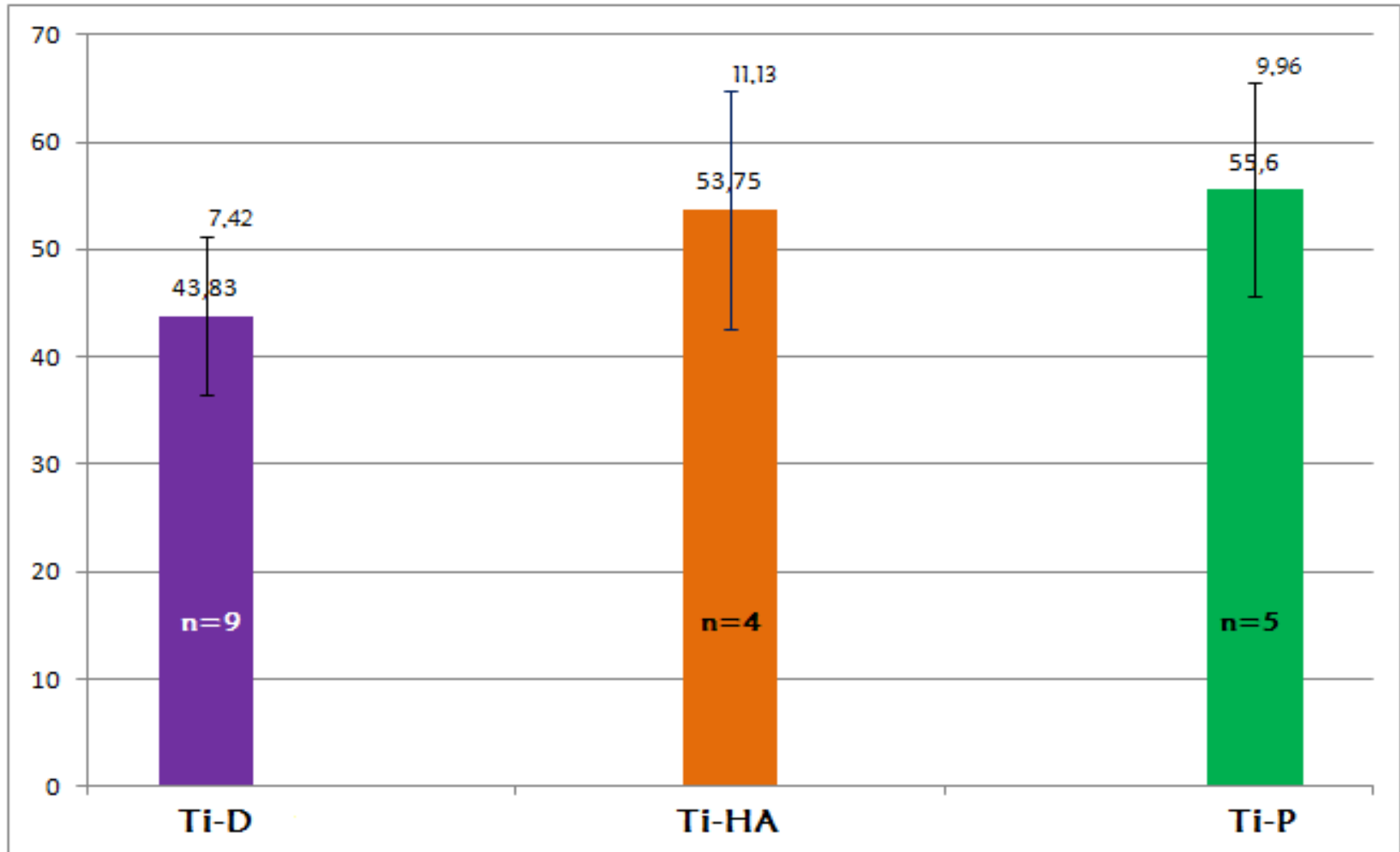
Ti-D vs Ti-P



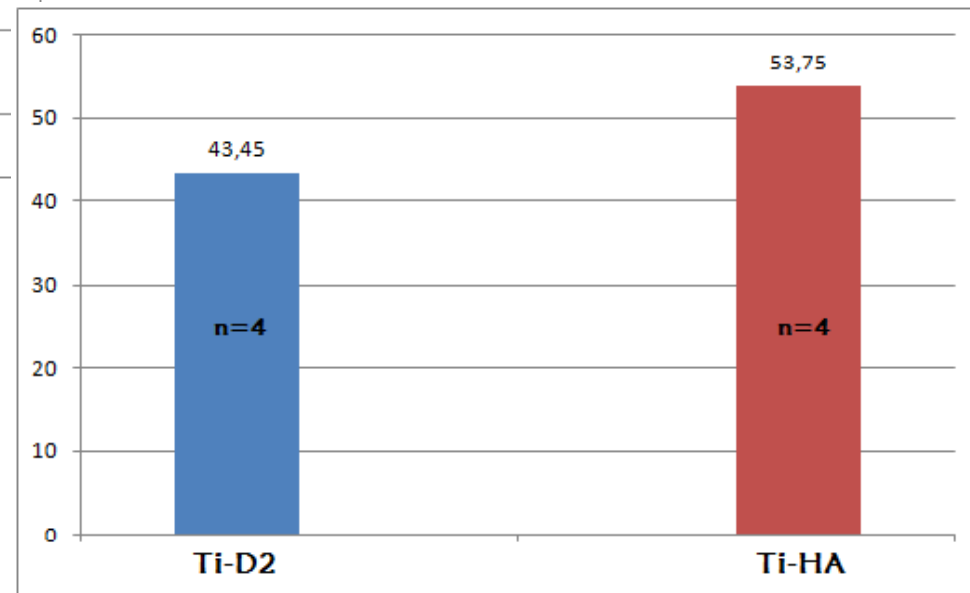
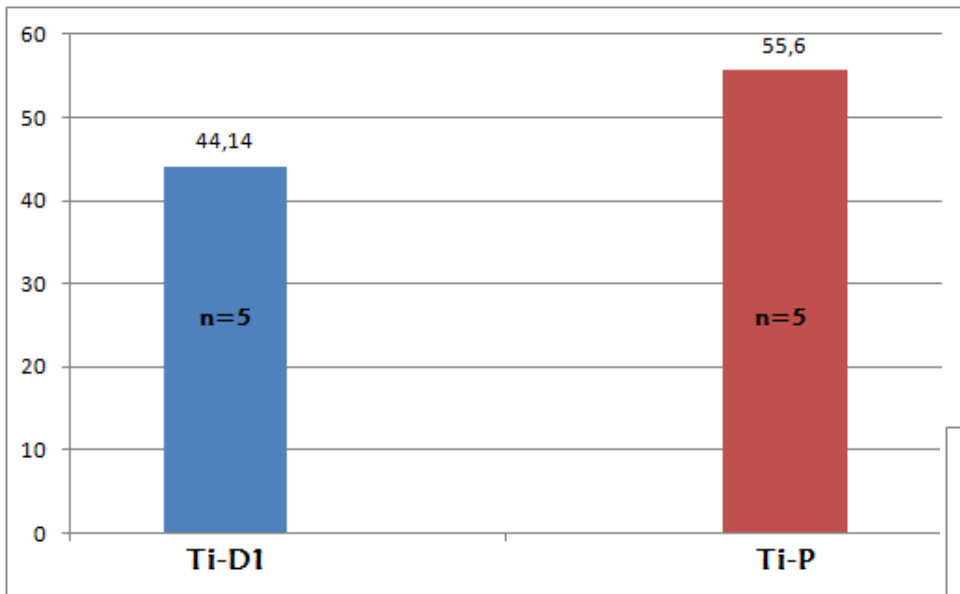
Ti-D vs Ti-HA



Estudio estadístico - Prueba ANOVA



Estudio estadístico - Prueba t para muestras apareadas





CONCLUSIONES

- ❖ Piezas de pequeño diámetro y buen acabado superficial,
 - ❖ Estabilidad de piezas implantadas,
 - ❖ Formación de tejido óseo en contacto con el material sin alteraciones,
 - ❖ Crecimiento de hueso dentro de poros del Ti-P,
 - ❖ Integración de la HA bovina con la HA del hueso, ratificando Bioactividad,
 - ❖ Confirmación de osteointegración y biocompatibilidad de los implantes,
 - ❖ Modelo experimental sistematizado y apto como ensayo biológico sugerido por ISO 10993
-

Propuestas para trabajos futuros

1. Aumentar el número de muestras para cada tipo de material.
 2. Incorporar forma de detección de fracturas en el post-operatorio, sin incluir la realización de placas radiográficas.
 3. Añadir un “análisis histológico” a los métodos de evaluación de la interfase hueso-implante.
 4. Desarrollar método o maniobra que asegure la implantación en la corteza.
 5. Considerando que la “Implantación” como ensayo recomendado por la Norma ISO 10993 no se practica en los laboratorios acreditados por la OAA, se propone integrarlo al Lab. De Biocompatibilidad de la FCEFyN.
-



**MUCHAS
GRACIAS**

Bianchi Julián – Maturana Stefanía