

Consideraciones sobre la experimentación *in vivo* en Argentina. Aplicación a un caso particular: implantes de titanio, titanio poroso y composite de titanio-hidroxiapatita.

M. Suarez, A. Rivarola, L. Grinschpun, C. Oldani, S. Maturana, J. Bianchi, J. Amietta, L. Boezio

*Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba
Av. Vélez Sársfield 1600, CGA5016, Córdoba, Argentina*

Resumen— Trabajar con animales de experimentación para realizar ensayos de biocompatibilidad *in vivo*, requiere del cumplimiento de diversos protocolos. Además, usar animales para el estudio tiene una serie de implicancias de orden ético y legal que se deben tener en cuenta cuando se planifican las experiencias.

En este trabajo se analizan los protocolos que hay que tener en cuenta en Argentina para la experimentación con animales de laboratorio. También se muestran, a modo de ejemplo, los resultados de ensayos *in vivo* de implantación de muestras de Ti (TiD), titanio poroso (TiP) y composite de titanio-hidroxiapatita (TiHA), obtenidos por proceso pulvimetalúrgico, en ratas de la cepa Wistar. Los procedimientos desarrollados para la selección de los animales, proceso quirúrgico y control posquirúrgico resultaron adecuados y se pudo comprobar buena adherencia del hueso con la superficie de los implantes y un inicio de formación de apatitas en los poros de los implantes porosos.

Palabras clave— implante de titanio, ensayo *in vivo*, oseointegración.

Abstract— Work with experimental animals to perform biocompatibility tests *in vivo*, requires compliance with various protocols. In addition, the use of animals for study has a number of ethical and legal implications that must be taken into account when planning experiences.

In this paper we analyze the protocols that must be taken into account in Argentina for experimentation with laboratory animals. As an example, the results of *in vivo* implantation tests using Ti (TiD), porous titanium (TiP) and titanium-hydroxyapatite (TiHA) samples, obtained by the powder metallurgical process, in Wistar rats are also shown. The procedures developed for animal selection, surgical procedure and post-surgical control were adequate. Good adhesion of the bone to the surface of the implants could be verified and also a start of apatite formation in the pores of the porous implants.

Keywords— titanium implant, *in vivo* test, characterization, osteointegration.

I. INTRODUCCIÓN

Los fabricantes de biomateriales tienen la obligación de establecer la seguridad y vida útil de sus productos antes de comercializarlos. Por esto, se deben realizar estudios preclínicos del potencial nocivo de los materiales o componentes para minimizar el riesgo clínico. Los productos médicos deben diseñarse y fabricarse con especial atención a la compatibilidad recíproca entre los materiales utilizados y los tejidos biológicos, células y líquidos corporales (biocompatibilidad), teniendo en cuenta la finalidad prevista del producto. Se ve, entonces, la necesidad de evaluar el desempeño de los biomateriales.

Para lograr esta evaluación, se deben utilizar sucesivos modelos experimentales (2):

- Modelos matemáticos (simulación por computadora)
- Modelos físicos o mecánicos
- Modelos biológicos:
 - Celulares y tisulares (*in vitro*)
 - Órganos aislados (*in vitro*)

- Animales (*in vivo*)

La calidad de la información que se puede obtener de un modelo está en relación directa con su complejidad. Los modelos biológicos suponen la mayor escala en la complejidad del modelo, ya que su utilización implica la incorporación de fenómenos propios de los sistemas vivos, cuyos efectos son difíciles de controlar y predecir por la variabilidad intrínseca del material biológico.

Actualmente, los controles de seguridad de los dispositivos médicos están guiados por los estudios recomendados por la *International Organization for Standardization* (ISO) en su norma ISO 10993 (3). La norma indica la evaluación metódica y cuantitativa de la biocompatibilidad de los componentes del biomaterial y sugiere que los estudios biológicos se vayan llevando a cabo siguiendo en orden el grado de complejidad de los mismos. Como la biocompatibilidad de un biomaterial está íntimamente relacionada con el comportamiento de las células en contacto con el material, lo primero a realizar son los ensayos biológicos *in-vitro*, y dentro de ellos es de particular importancia la citotoxicidad, así como la

adhesión celular a la superficie del material y su proliferación.

En el paso siguiente, los animales de experimentación constituyen el nivel más alto de complejidad de todos los modelos experimentales y por tanto el más próximo a las condiciones reales. Su utilización implica, sin embargo, la disponibilidad de instalaciones y personal especializados y, por esta razón, siempre deben estar precedidos por resultados positivos en experimentaciones *in vitro*.

Por otro lado, la experimentación con animales tiene una serie de implicancias de orden ético y legal que deben tenerse en cuenta a la hora de planificar experimentos con estos modelos.

Marco legal

En la República Argentina no existe un marco legal completo que regule la experimentación con animales (2, 4). En el año 2001 la Asociación Argentina de Experimentación con Animales de Laboratorio (AADEAL), presentó un proyecto de ley para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, que aún no ha sido tratado. Ante la falta de una legislación específica, correspondería la aplicación de la Ley 14346 de Protección de los Animales, del año 1954.

Para el funcionamiento de Bioterios de animales para experimentación deben tenerse en cuenta la Disposición 6344/96 de ANMAT (5) y la Resolución 617/2002 de SENASA (6).

Por otra parte, las Universidades y laboratorios tienen sus propios manuales de procedimiento y de manejo de los animales de experimentación, así como de la instalación y mantenimiento de sus bioterios. En el ámbito de la FCEFYN de la Universidad Nacional de Córdoba existe el CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio), cuyas funciones son revisar, aprobar y supervisar todos los protocolos de investigación que incluyan animales de laboratorio (7).

Consideraciones bioéticas

La bioética comprende los problemas relacionados con valores, conductas y principios que surgen en todas las profesiones de la salud y son aplicados a las investigaciones biomédicas (8). Un concepto importante en la concepción aceptada actualmente es el de bienestar animal. Se lo entiende como una característica individual que incluye la magnitud del éxito del animal para sobreponerse a todos los efectos ambientales. Así un individuo que no es exitoso, puede llegar a enfermarse, estar herido o incluso morir.

Las bases para el estudio y mejoramiento del bienestar animal en la experimentación se basa en dos conceptos (9): las Cinco Libertades y las tres R.

Las Cinco Libertades de los animales son:

1. Que no padezcan hambre ni sed.
2. Que no sufran malestar físico ni dolor.
3. Que no sufran heridas ni enfermedades.
4. Que puedan ajustarse a su comportamiento normal y esencial.
5. Que no sufran miedo ni angustia.

Las tres R tienden a que el investigador considere técnicas alternativas relacionadas con:

1. Reemplazar los animales en la investigación
2. Reducir el número de animales utilizados

3. Refinar la metodología para minimizar el sufrimiento

Modelo experimental

Históricamente se ha utilizado una extensa variedad de animales como sujetos experimentales para estudios *in vivo* que impliquen reparación ósea. Durante mucho tiempo, se prefirieron mamíferos grandes, tales como perros, ovejas o conejos (10). Esto se debe a que el proceso de regeneración del hueso en estas especies es más representativo de lo que ocurre en el ser humano. Al mismo tiempo, al tratarse de escalas similares, se facilita el traslado de procesos quirúrgicos, implantes e instrumental usado en personas.

Sin embargo, el empleo de roedores en estudios de regeneración ósea tiene una serie de ventajas características (11):

- El almacenamiento de animales es más simple y menos costoso, tanto por la infraestructura necesaria y por los costos operativos, como por los de limpieza y alimentación.
- Al ser animales más pequeños, el espacio necesario para el bioterio se reduce.
- Los períodos de gestación son menores, lo que permite tener grupos de estudio mayores en menor tiempo.
- La trazabilidad genética en ratas y ratones de laboratorio está, en general, bien definida, y estos animales usados para investigación, son menos costosos que otros de mayor tamaño.

Una desventaja de la disminución de tamaño del sujeto experimental es el mayor desafío tanto para la manipulación durante los procesos quirúrgicos como para la manufactura de implantes.

Para el diseño del modelo experimental existen una serie de factores que pueden afectar los resultados y deben ser tenidos en cuenta, como son la edad y sexo del animal y el uso de diferentes drogas a lo largo del proceso (anestésicos, analgésicos, antibióticos).

Influencia de la edad del animal:

Tiene un impacto fundamental en el proceso de regeneración, ya que el tiempo necesario para que éste ocurra se multiplica con la edad. Se ha demostrado (12) que el crecimiento óseo en ratas continúa mucho tiempo después de alcanzada su madurez sexual, por lo que resulta adecuada la elección de animales maduros (adolescencia - adulto), teniendo en cuenta la importancia de que los grupos de estudio estén compuestos por sujetos de edades similares para disminuir la variabilidad de resultados.

Influencia del sexo del animal:

No se conoce demasiado sobre la influencia del sexo en la regeneración ósea. Estudios han demostrado aparentes ventajas en la reparación ósea en machos (11). Adicionalmente, los machos son, a igualdad de edad, de mayor tamaño, lo que puede redundar en mayor facilidad del proceso quirúrgico en el caso de una implantación. En ratas hembra la participación de las hormonas responsables del ciclo estral podrían dificultar la interpretación de los resultados debido a su influencia en el momento de realizarse el implante y/o en el momento del sacrificio. Si bien se ha afirmado que los machos tienen menor susceptibilidad a daños en el esqueleto que las hembras (13), no se consideraría determinante, siempre que se evite

incluir tanto machos como hembras, para evitar diferentes condiciones en el mismo grupo de estudio.

Influencia de la administración de anestésicos, analgésicos y antibióticos:

El uso de analgésicos suele ser indispensable en investigación experimental con animales. Para definir las necesidades es importante el monitoreo de la conducta del animal, y debe aplicarse el control del dolor para disminuir al mínimo posible su sufrimiento. Está difundido el uso de antiinflamatorios no esteroideos, tal como el ibuprofeno, aunque hay resultados controversiales sobre su efecto en la regeneración ósea (11).

De igual manera, hay distintas posiciones sobre el uso de antibióticos. En general se considera que cuidando las condiciones de esterilidad y asepsia de los procedimientos, la tasa de infecciones es baja cuando se trabaja con ratas.

Lo aceptado es que el tratamiento con antibióticos debería ser tomado con precaución, y, al igual que la administración de cualquier otra droga, es de fundamental importancia la documentación y reporte preciso de las dosis utilizadas en cada caso.

Tipo de probeta – Posición del implante

La normativa prevé diversos lugares de implantación en los animales. Los más comunes por su facilidad quirúrgica son los ensayos subcutáneos o transdérmicos. Sin embargo, éstos no son adecuados para evaluar el comportamiento de implantes óseos. Para estos casos, se utilizan dos tipos de modelos de implantación: intramedular y transcortical (Figura 1). En el caso de los transcorticales (13-16), se implantan realizando un defecto en la corteza, llegando al canal medular, donde se coloca la probeta. Los más comunes son de forma cilíndrica o roscada. La implantación transcortical tiene la ventaja de representar una situación de mayor similitud a la de un implante real (en contacto con hueso cortical y medular, así como tejidos blandos periimplantarios). Como desventaja requieren una cirugía más compleja con mayor riesgo de fracaso de la experiencia ya que al no ser implantes cementados, se requiere que el defecto óseo donde se coloque la probeta se ajuste a ella muy precisamente, para que no se mueva durante la cicatrización.

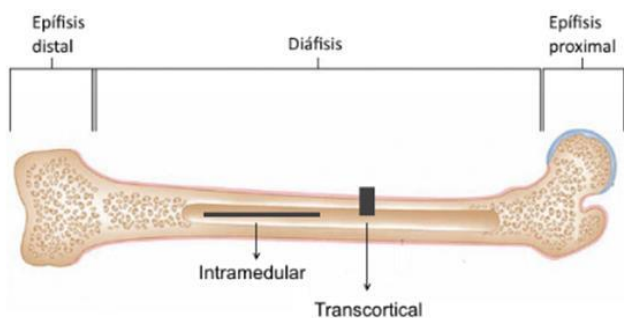


Figura 1: Esquema de implantes intramedular y transcortical en fémur.

Los implantes intramedulares tienen, en general, forma de una lámina delgada del material a evaluar (17,18). Se insertan completamente en el canal medular, sin contacto con la corteza. Tiene la ventaja de minimizar la posibilidad de fracaso por el movimiento de la probeta, ya que se encuentra enclavada en el seno de la médula ósea, sin estar sujeta a cargas. Al mismo tiempo, por su menor tamaño, requiere la realización de un defecto menor en el hueso. Como desventaja, es un modelo menos representativo de

una prótesis real y de difícil fabricación debido a su tamaño.

Sitio de implantación

Generalmente cuando se trabaja con animales pequeños, los huesos largos como el fémur y la tibia son apropiados para estudiar los mecanismos implicados en la reparación del tejido óseo.

La tibia tiene una configuración triangular, presenta una curvatura en su eje longitudinal y su calibre disminuye en las partes distales (19), esto conlleva a una mayor sofisticación en el diseño de implantes. Por otra parte su acceso resulta menos traumático debido a la delgada capa muscular que lo recubre.

El fémur es un hueso tubular de mayor diámetro que la tibia, y por ello su ventaja radica en la posibilidad de aplicar implantes de mayores dimensiones. El importante paquete muscular que lo rodea le aporta contención, pero también dificulta en parte su abordaje.

Variables para medir la oseointegración

Las propiedades de la interface hueso-implante están determinadas por la cantidad de la superficie del implante en contacto directo con tejido óseo mineralizado, así como también por la calidad mecánica de ese tejido formado alrededor del material implantado (20). Las variables más usadas para cuantificar la oseointegración son:

- Contacto hueso-implante (BIC – Bone to Implant Contact) es la condición sin la cual no ocurre la oseointegración de los implantes (21). Es expresada como el porcentaje de la longitud del implante en el que hay contacto con el hueso directamente, sin intervención de tejido fibroso (22). La técnica más utilizada para cuantificar el BIC es el uso de imágenes histológicas obtenidas con microscopía. Entre los factores que influyen en los niveles de BIC pueden mencionarse la densidad original del hueso, los valores de las fuerzas funcionales ejercidas sobre los implantes, la configuración, geometría y dimensiones de los mismos y su rugosidad superficial (23).

- Porcentaje de neoformación ósea (24), se calcula como la relación entre el área total de tejido en la vecindad del implante, y el porcentaje de esa área que está ocupado por hueso.

- Una forma alternativa de evaluar la oseointegración es la determinación de la composición química del área de contacto entre el tejido y el biomaterial. La misma puede obtenerse a partir de análisis elemental con EDS-SEM, considerando las concentraciones de calcio (Ca) y fósforo (P) presentes en la interfaz hueso-implante (25-27). Calcio y fósforo son indicadores del proceso de recambio celular, y su presencia se utiliza como evidencia de existencia de hueso maduro (28). A su vez, se ha descrito la relación Ca/P como una medida de la calidad del hueso, y se ha demostrado que éste cociente disminuye en casos en los que se observa pérdida de tejido óseo (29-31).

A partir de las consideraciones anteriores, en este trabajo se presentan, a modo de ejemplo, los resultados de ensayos de implantación in vivo en ratas Wistar. Los implantes fueron de titanio, titanio poroso y composite de titanio-hidroxiapatita, obtenidos por técnicas pulvimetalúrgicas.

II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Las muestras de implante de titanio denso (TiD), titanio poroso (TiP) y titanio-hidroxiapatita (TiHA), fueron elaboradas siguiendo la misma metodología pulvimetalúrgica ya informada (32,33). En la Tabla 1 se muestran los principales parámetros del proceso.

En la etapa a 200 °C se elimina por sublimación el separador de bicarbonato de amonio utilizado, dejando poros en el material. En la etapa a 500 °C se descompone el hidruro de titanio y se elimina el hidrógeno. Como se ve de la Tabla, todos los sinterizados se realizaron a 800 °C en atmósfera de argón de alta pureza.

TABLA 1
PARÁMETROS DEL PROCESO DE SINTERIZADO

Muestra	Materia prima en polvo	Ciclo térmico de sinterizado
TiD	TiH ₂	30 min a 500 °C + 45 min a 800 °C
TiP	TiH ₂ + 10% NH ₄ HCO ₃	30 min a 200 °C + 30 min a 500 °C + 45 min a 800 °C
TiHA	TiH ₂ + 20% hidroxiapatita bovina	30 min a 500 °C + 45 min a 800 °C

Selección de los animales

Para los ensayos in vivo, en este trabajo se utilizaron 12 ratas de la cepa Wistar provenientes del Bioterio de la FCEfyN-Universidad Nacional de Córdoba. Los animales se eligieron machos adultos jóvenes, de entre 8 y 12 semanas de edad.

Tamaño del implante y posicionamiento

Como sitio de implantación se eligió el fémur de las ratas. Los implantes, con un diámetro aproximado de 2,3 mm y 1 mm de altura, se colocaron de manera transcortical.

Procedimiento de ensayo

Limpieza y esterilización

Para que los implantes puedan estar en condiciones para la cirugía, se realizó primero un lavado ultrasónico en agua destilada (Lavador Ultrasónico, Testlab) durante 30 minutos, seguido de un baño en alcohol a 70 °C también de 30 minutos. La esterilización se realizó con calor seco. El proceso de esterilización seleccionado fue: 180 °C durante 30 minutos, según guía del Ministerio de Salud de la Nación [36].

Implantación de los sujetos experimentales

Se determinó implantar dos piezas por animal, una en cada pata, de las cuales las 12 izquierdas serían los "controles" de titanio denso (TiD) mientras que las 12 patas derechas alojarían 6 de titanio poroso (TiP) y 6 de titanio e hidroxiapatita (TiHA).

Al momento de realizar los implantes todas poseían una edad de 11 semanas y un peso entre 350-500 gr.

Cirugías

Las cirugías fueron programadas para ser completadas en una semana. Los animales fueron anestesiados con Hidrato de Cloral al 6% (420 mg/Kg de peso corporal). La inyección fue intraperitoneal y luego de aproximadamente 5 minutos se realizó prueba de ausencia de reflejo palpebral y de ausencia de respuesta motora ante estímulo.

Para realizar el acceso por la cara anterolateral del muslo, primero se desinfectó con alcohol y luego se rasuró. Se realizó el corte, incisión y separación de los músculos bíceps femoral y glúteo mayor.

La trepanación del hueso fue realizada con un torno odontológico eléctrico adosado a una fresa esférica de 1,5 mm de diámetro. Los implantes fueron colocados a mano ejerciendo presión hasta que quedaron ubicados en el sitio de implantación. Una vez colocados, se suturaron los cortes con agujas e hilo de Nylon. Se administró Ibuprofeno inyectable como analgésico para la recuperación.

Postoperatorio mediato e inmediato

Una vez realizadas las intervenciones quirúrgicas, se controló que la recuperación de la anestesia en las ratas se produjera en un periodo de tiempo de entre 30 a 45 minutos. Se controló la temperatura ambiente constante a 28 °C.

En cuanto al seguimiento postquirúrgico luego de las primeras 24 horas y durante las semanas siguientes (seguimiento mediato), los animales fueron alojados en el Bioterio de la FCEfyN, manteniéndose el régimen de temperatura constante y alimentación balanceada. Se realizó un seguimiento en base al peso de las ratas, a la cantidad de agua que bebían, a la ingesta de comida, apariencia del pelaje y por sobre todo, del andar y el apoyo de las patas sobre el piso de la caja donde estaban alojadas.

Sacrificio

Transcurridas las 4 semanas posteriores a las cirugías, se procedió al sacrificio de las ratas en el mismo orden en que fueron operadas. El método empleado fue una sobredosis de anestesia inyectable (Hidrato de Cloral) de forma intraperitoneal, que a los pocos minutos hace efecto, detectándose por la ausencia de signos vitales.

El siguiente paso fue la extracción del fémur comenzando por cortar la pata muslo y luego la articulación de la rodilla. Las muestras (hueso con implante) se almacenaron en tubos con formol y se les hizo radiografías para identificar la posición del implante. De los resultados se descartaron cuatro muestras que presentaban fractura y una que presentaba el implante fuera del hueso. También se evidenció ausencia de borde radiolúcido en las placas radiográficas de las piezas lo que indica que el implante se encuentra oseointegrado, descartando que haya fibrointegración.

Caracterización

Luego de la extracción de los huesos del animal, se procedió a la fijación en formol durante 20 días. Luego se realizó la deshidratación, donde las muestras reposaron un día en Acetona (Pro Análisis A.C.S., Cicarelli Laboratorios, San Lorenzo, Argentina) y agua destilada al 50% v/v y el segundo día en acetona al 100%. En el día tres la acetona fue mezclada con monómero (50% v/v) y en el día 4 con monómero 100%. Seguidamente, la inclusión se realizó en resina poliéster (Resina pre-acelerada P101510, Todo Droga, Córdoba, Arg.). Luego se procedió al corte de las muestras con sierra de mano y fresado a máquina (José M. Alladio e Hijos S.A.). Una vez cortadas y fresadas se pulieron con papel abrasivo de granulometría decreciente.

Las muestras restantes se observaron con lupa estereoscópica (ST-30-2L, Konus), y microscopía electrónica de barrido (MEB) (FE-SEM Sigma, Carl Zeiss). La determinación de los porcentajes relativos de P y Ca en

la interfase hueso-implante se hizo mediante análisis elemental con EDS-SEM del mismo equipo anterior.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que las características topográficas de la superficie del implante en la interfase implante-hueso tienen fuerte influencia sobre la calidad de la oseointegración alcanzada (34), fue imprescindible analizar primero las características metalográficas de las muestras en estudio. El proceso de sinterizado a la baja temperatura utilizada en este trabajo, deja poros pequeños en la muestra TiD, debido al sinterizado incompleto, mientras que los poros de la muestra TiP llegan a alcanzar los 350 μm con una morfología irregular. La presencia de la hidroxiapatita en las muestras TiHA genera porosidad en el composite a pesar de que en estas muestras no se agregó separador, por lo que no se presentan poros grandes. Estas diferentes morfologías superficiales van a influenciar la adhesión celular ya que, como encontró Spoerke (35), las células tienden a apoyarse mediante extensiones como un puente sobre todos los poros menores a 75 μm y se adhieren relativamente fáciles dentro de poros con un tamaño mayor a los 200 μm .

Los resultados publicados por Comin et. al. [33], de citotoxicidad, adhesión y proliferación celular in vitro en líneas celulares epiteliales Vero y células fibroblásticas NIH 3T3, de acuerdo a la norma ISO 10993 (3) realizados a muestras fabricadas con la técnica indicada en la Tabla 1, arrojaron buenos resultados mostrando que los materiales estudiados resultaron no tóxicos en cultivo celular para ninguna de las dos líneas celulares. Las células tuvieron la capacidad de adherirse a la superficie de las muestras, proliferando sobre la superficie y sin presentar alteraciones morfológicas.

En base a estos resultados positivos, en este trabajo se prepararon los protocolos para la realización de los ensayos in vivo. Los mismos se siguieron cuidadosamente tanto en lo referente a la selección de los animales como al procedimiento de cirugía y a los pasos posoperatorios.

Los animales utilizados (ratas de la cepa Wistar, machos adultos jóvenes, de entre 8 y 12 semanas de edad), se eligieron para poder garantizar que presentaran madurez ósea con períodos de curación relativamente cortos (cuatro a seis semanas).

Como sitio de implantación se eligió el fémur por tratarse del hueso largo de mayor calibre. El menor diámetro de éste hueso en ratas Wistar adultos jóvenes (entre 10 y 14 semanas) es de $3,18 \pm 0,11$ mm y $3,33 \pm 0,15$ mm respectivamente. Éstas dimensiones fueron utilizadas para definir la geometría del material de implante.

Se optó por usar un modelo de implantación transcortical, que admite tamaños de probeta mayores que el intramedular. Se definió el diámetro aproximado del implante en 2,3 mm, tomando como referencia el tamaño del fémur del sujeto experimental. Se consideró que un tamaño aproximadamente 1 mm inferior al diámetro total del fémur daba margen suficiente para realizar la trepanación del sitio de implante. Para asegurar la estabilidad del implante, se usó una fresa de diámetro igual al agujero de la trepanación de modo que una vez colocado, este permanezca en estrecho contacto con el hueso. La respuesta del hueso en presencia de un implante depende de muchos factores que incluyen, entre otros, la estabilidad y grado de micromovimientos entre el implante

y el hueso, y la presencia de un espacio (gap) entre el implante y la superficie del hueso [37]. En el presente estudio se buscó que la trepanación fuera de un diámetro tal de minimizar el posible gap, procurando tener que introducir el implante ejerciendo una presión moderada con la mano.

En la Figura 2a se muestra trepanación en el hueso de la rata y en la Figura 2b, uno de los huesos fémur recién extraídos.



Figura 2: (a) Trepanación y posicionamiento del implante; (b) hueso fémur extraído.

A. Lupa estereoscópica

En la Figura 3 se observan dos imágenes con lupa estereoscópica de cortes transversales realizados a las muestras obtenidas. Se ve que el implante de la muestra en la Figura 3a está bien ubicado en la corteza del hueso mientras que la Figura 3b presenta un implante que penetra hasta la médula ósea.

En las dos se puede ver que las piezas metálicas están adheridas totalmente a la corteza ósea.

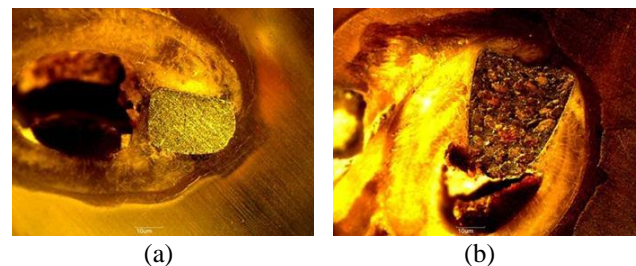


Figura 3: Observación con lupa estereoscópica (20X). (a) Muestra de TiD en la corteza; (b) muestra de TiHA en la corteza y la médula.

B. Microscopía electrónica

Mediante las imágenes de microscopía electrónica se pretendió evaluar la implantación de manera cualitativa y cuantitativa y determinar con mayor exactitud la calidad de las interfases hueso-implante de cada una de las muestras. La información obtenida permitió determinar la presencia de tejido óseo compacto en los bordes de todas las piezas implantadas.

En la Figura 4 se muestran imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB) de tres muestras representativas de cada tipo de material: TiD, TiP y TiHA. Se puede ver que los tres casos presentan una buena adaptación de la pieza con el tejido circundante al hueso.

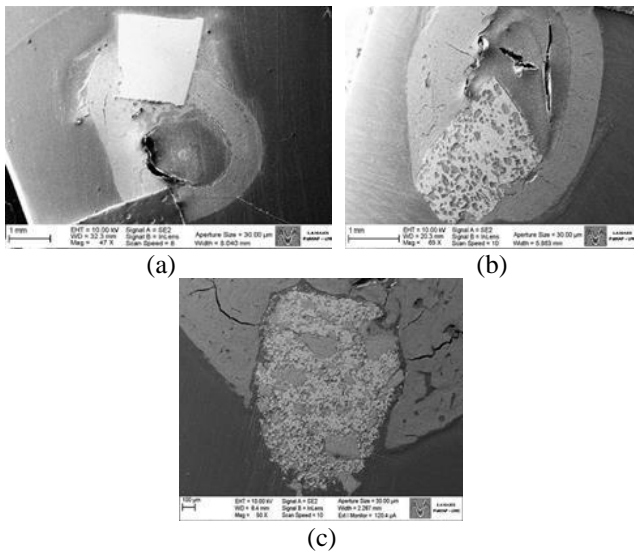


Figura 4: Fotomicrográficas de los implantes de (a) TiD; (b) TiPM; (c) TiHA.

C. Determinación de la oseointegración

El contenido de calcio, fósforo y la relación Ca/P, obtenidos de los mapeos completos en todas las muestras, se usó como una forma de evaluar la oseointegración y la calidad de formación del hueso nuevo. En la Figura 5a se muestra un ejemplo del mapeo de Ca y P en un implante poroso. Se pudo evidenciar la presencia de apatitas en los poros internos superficiales de todas las piezas de TiP, indicando un inicio de regeneración ósea y asegurando que la interconectividad de los poros de la pieza ha favorecido el crecimiento interno (Figura 5b). Esto permite un mejor agarre mecánico del implante al hueso. Trabajos sobre biomateriales porosos encontraron que la curación inicial del hueso herido empieza antes de las dos semanas [38], mientras que el crecimiento del hueso en el interior de los poros se da a partir de las cuatro semanas [39] y se completa alrededor de las 12 semanas. En este trabajo no se determinó la evolución anterior pero se comprobó que a las cuatro semanas de la implantación había apatitas dentro de los poros superficiales.

El valor de la media de Ca/P más bajo fue de 1,57 correspondiente a las muestras de Ti, seguido del que representa a las de TiHA con 1,71 y por último 1,80 del TiP, comparados con la hidroxiapatita de los huesos que posee un ratio Ca/P ideal de 1,67. Muchos estudios en la literatura reportan relaciones Ca/P entre 0.5 y 1.9 [40]. Esta relación se iría modificando durante la etapa de formación de hueso que dura al menos 12 semanas. Por otra parte se afirma [41] que el comportamiento de las cerámicas de fosfato de calcio en relación a la unión al hueso, no varía con la relación molar Ca/P y por lo tanto, se puede esperar que las apatitas formadas en los poros generen una buena interfase con el hueso. Así, se concluyó que en los animales que recibieron implantes de TiP, se evidencia formación de “nuevo hueso” con gran incremento de calcio y fósforo en los poros superficiales, comprobando una mejor compatibilidad por encima del TiD. Las muestras de TiHA presentan mayor citocompatibilidad y mejor adherencia celular que el TiD. Sin embargo, la dificultad en su procesamiento (necesidad de sinterizar a baja temperatura) no muestra, a priori, una ventaja competitiva de este material frente al TiP.

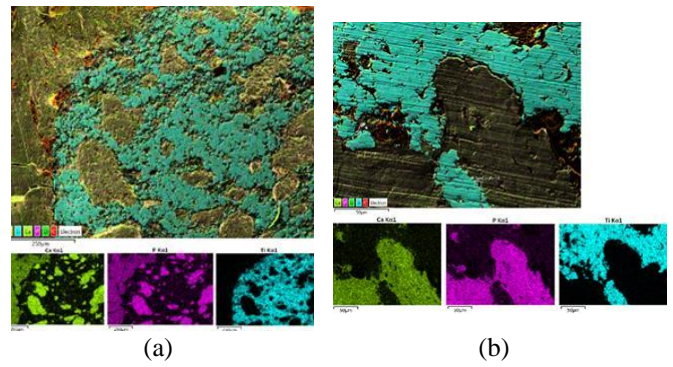


Figura 5: Mapeos de Ca, P y Ti con EDS-SEM. (a) Implante de TiHA y (b) Uno de los poros en un implante de TiP.

También se determinó el contacto hueso-implante (BIC - Bone to Implant Contact) mediante el uso de las imágenes histológicas obtenidas con microscopía electrónica, y considerado como el porcentaje de la longitud del implante en el que hay contacto con el hueso directamente, sin intervención de tejido fibroso. Este valor se calculó como:

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

Como se puede deducir de lo presentado, la cantidad de resultados obtenidos resulta escasa para realizar estudios estadísticos completos. Sin embargo, para evaluar si las diferencias en las medias del %BIC pertenecientes a los materiales de ensayo y control eran estadísticamente significativas como para afirmar una mejor relación hueso-implante en un tipo de pieza, como primera aproximación se procedió a realizar la prueba t de Student para muestras apareadas y la prueba ANOVA. Previamente se comprobó el cumplimiento de las condiciones de distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) e igualdad de varianzas (prueba de Levenne) considerando un intervalo de confianza del 95%.

En las pruebas se compararon los tres grupos de muestras compuestos por los distintos tipos de biomateriales estudiados (TiD, TiP y TiHA). Los resultados de la prueba ANOVA se muestran en la Figura 6. Los valores más altos de porcentajes de BIC fueron los de TiP seguidos por los de TiHA con medias muy cercanas, ambos con valores de %BIC superiores a los de TiD, indicando mejor oseointegración.

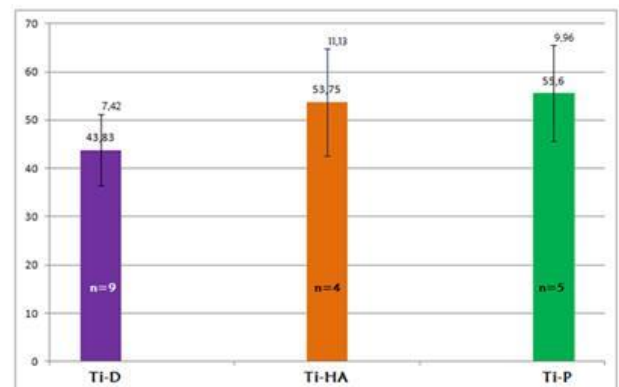


Figura 6: Análisis del %BIC mediante prueba ANOVA

IV. CONCLUSIONES

Los estudios de biocompatibilidad propuestos por la norma ISO 10993 obligan a la realización de un trabajo

profesional multidisciplinario, tanto para los ensayos in vitro como para las experiencias in vivo. La experimentación con animales requiere un cuidadoso seguimiento de protocolos de ensayos, los cuales no siempre están establecidos y es un deber de los profesionales involucrados desarrollarlos adecuadamente.

En este trabajo se analizaron las implicancias ético-legales que hay que tener en cuenta en Argentina para la experimentación con animales de laboratorio y, teniendo en cuenta las mismas, se desarrolló un protocolo de ensayo para la implantación en animales vivos.

Así mismo, se presentaron y discutieron los resultados de ensayos de implantación en ratas de la cepa Wistar, de muestras de titanio (TiD), titanio poroso (TiP) y composite titanio-hidroxiapatita (TiHA), todas obtenidas por pulvimetalurgia. De los mismos se puede concluir que los protocolos de cirugía y cuidado animal implementados fueron adecuados. El análisis de las muestras implantadas de TiD, TiP y TiHA permitió constatar la oseointegración mediante la presencia de formaciones apatíticas. Sin embargo, no se encontró una ventaja competitiva de las muestras de TiHA con respecto a las de TiP, aunque ambas se presentan con mejor citocompatibilidad que las de TiD.

REFERENCIAS

- [1] J.F. Del Cañizo López, D. López Martín, E. Lledó García, P. García Barreno. Diseño de modelos experimentales en investigación quirúrgica. *Actas Urológicas Españolas*. 2008; 1(32), pp. 27-40.
- [2] M.A. Abalos, S.E. Belchior. *Bioética y experimentación con animales en Argentina*. Revista Veterinaria Argentina. 2015 Enero; XXXII (321).
- [3] *International Organization for Standardization*, ISO 10993-1: 2009. Biological evaluation of medical devices Part 1: Evaluation and testing in the risk management process.
- [4] CICVyA INTA. INTA Online. [consulta 4/8/2015. Disponible en: http://inta.gob.ar/documentos/leyes-decretos-disposiciones/at_multi_download/file/Normativa%20Nacional%20pdf.pdf].
- [5] ANMAT. Disposición 6344/96: *Reglamentación para bioterios de laboratorios elaboradores de especialidades medicinales y/o análisis para terceros*. 1996..
- [6] SENASA. Resolución 617/2012: *Requisitos, condiciones y procedimientos para la habilitación técnica de laboratorios que posean bioterios de producción, mantenimiento y local de experimentación*. 2012.
- [7] CICUAL FCEFYN. Portal FCEFYN. [Online].; 2014 [cited 2015 Agosto 8. Available from: http://www.efn.uncor.edu/archivos/investigacion/cicual/RHCD_571_2014_Reglamento_CICUAL.pdf.
- [8] L.F. Garcés Giraldo, C. Giraldo Zuluaga. Bioética en la experimentación científica con animales: cuestión de reglamentación o de actitud humana. *Revista Lasallista de Investigación*. 2012; IX (1).
- [9] Comité Asesor de Bioética - FONDECYT-CONICYT. Aspectos bioéticos de la experimentación animal. In J. Gimpel *Aspectos bioéticos en el uso de animales de experimentación*.; 2009. p. 23-38.
- [10] P.M. Conn. *Animal Models for the Study of Human Disease* 2nd Edition, Editorial Elsevier, 2017.
- [11] T. Histing, P. Garcia, J.H. Holstein, M. Klein, R. Mathys, R. Nuetzi, et al. Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*. 2011 49 (4), pp. 591-599.
- [12] S.H. Kilborn, G. Trudel, H. Unthoff. Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemporary topics in laboratory animal science*. 2002; 41 (5), pp. 21-26.
- [13] H. Duranova, M. Martiniakovo, R. Omelka, B. Grosskopf, I. Bobonova, R. Toman. Changes in compact bone microstructure of rats subchronically exposed to cadmium. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2014; 56 (1), pp. 56-64.
- [14] C.M.L. Clokie, H. Warshawsky. Morphologic and Radioautographic Studies of Bone Formation in Relation to Titanium Implants Using the Rat Tibia as a Model. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 03/1995; 10 (2), pp. 155-165.
- [15] L. Vasconcellos, Y. Rodarte Carvalho, R. Falchete do Prado, L.G. Oliveira de Vasconcellos, M. Lima de Alencastro Graça, C.A. Alves Cairo. Porous Titanium by Powder Metallurgy for Biomedical Application: Characterization, Cell Cytotoxicity and in vivo Tests of Osseointegration. In *Biomedical Engineering - Technical Applications in Medicine*. Ed. INTECH, 2012; Cap.2, pp. 47-74.
- [16] R.M. Wazen, L.P. Lefebvre, E. Baril, A. Nanci. Initial evaluation of bone ingrowth into a novel porous titanium coating. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*. 2010; 94B (1), pp. 64-71.
- [17] M.T. Gait, S. Fontana, M. Plavnik, A. Díaz, A. Malberti. Efecto del alendronato sobre la remodelación del tejido óseo. Estudio experimental. *Claves de odontología*. 2010; 68, pp. 9-19.
- [18] R.L. Cabrini, M.B. Guglielmotti, J.C. Almagro. Histomorphometry of initial bone healing around zirconium implants in rats. *Implant dentistry*. 1993; 2(4), pp. 264-267.
- [19] J.H. Holstein, P. García, T. Histing, T. Kristen, C. Scheuer, M.D. Menger, et al. Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J. Orthop Trauma*. 2009; 23 (5), pp. 31-38.
- [20] V. Mathieu, R. Vayron, G. Richard, G. Lambert, S. Naili, J.Pea Meningaud. Biomechanical determinants of the stability of dental implants: Influence of the bone-implant interface properties. *Journal of Biomechanics* 2014; 47 (1). pp. 3-13.
- [21] J.L. Calvo-Guirado, A. Aguilar-Salvatierra, J. Guardia, R. Delgado-Ruiz, M.P. Ramírez-Fernández, Cea. Pérez Sánchez. Evaluation of periimplant bone neoformation using different scanning electron microscope SEM methods for measuring BIC. A dog study. *J Clin Exp Dent*. 2012; 4 (1), pp. 8-13.
- [22] C. Manresa, M. Bosch, M.C. Manzanares, P. Carvalho, J.J. Echevarría. A new standardized-automatic method for bone-to-implant contact histomorphometric analysis based on backscattered scanning electron microscopy images. *Clin. Oral Impl. Res*. 2014; 25 (6), pp. 702-706.
- [23] A.M. Martínez Rodríguez. Evaluación de la formación de hueso periimplantario mediante diferentes métodos de medida del contacto hueso-implante. Estudio experimental en perros mediante microscopía electrónica de barrido. Tesis de doctorado, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia; 2012.
- [24] D. de Olivera Leite. Estudo da osseointegração de implantes porosos submetidos ao tratamento biomimético. Tesis de Maestría. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Odontologia; 2011.
- [25] W. Jingyu, W. Lin, G. Yong, Z. Jinsong, Z. Cuicui. Experimental study on the osseointegration of foam TiC/Ti composites. *Biomed. Mater*. 2013; 8 (4), pp. 1-14.
- [26] S. Ceconi, M. Mattioli-Belmonte, S. Manzotti, M. Orciani, A. Piccioli, A. Gigante. Bone-derived titanium coating improves in vivo implant osseointegration in an experimental animal model. *J Biomed Mater Res Part B*. 2014; 10 (2), pp. 303-310.
- [27] I. Braceras, J.I. Alava, J.I. Oñate, M. Brizuela, A. Garcia-Luisa, Nea. Garagorria. Improved osseointegration in ion implantation-treated dental implants. *Surface and Coatings Technology*. 2002; 158-159, pp. 28-32.
- [28] R. Depprich, H. Zipprich, M. Ommerborn, E. Mahn, L. Lammers, J. Handschel, et al. Osseointegration of zirconia implants: an SEM observation of the bone-implant interface. *Head & Face Medicine*. 2008; 4 (25). Published online 2008 Nov 6. doi: 10.1186/1746-160X-4-25.
- [29] F.A. Shah, B. Nilson, R. Brånemark, P. Thomsen, A. Palmquist. The bone-implant interface – nanoscale analysis of clinically retrieved dental implants. *Nanomedicine*. 2014; 10 (8), pp. 1729-1737.
- [30] P. Sotiropoulou, G. Fountos, N. Martini, V. Koukou, C. Michail, I. Kandarakis. Bone calcium/phosphorus ratio determination using dual energy X-ray method. *Phys Med*. 2015; 31 (3), pp. 307-313.
- [31] P. Berillis, D. Emfietzoglou, M. Tzaphlidou. Collagen fibril diameter in relation to bone site and to calcium/phosphorus ratio. *The Scientific World Journal*. 2006; 6, pp. 1109-1113.
- [32] L. Grinschpun, C. Oldani, M. Schneiter, M. Valdemarin, J. Pereyra. Obtención de compuesto de titanio con gradiente de porosidad radial mediante técnica pulvimetalúrgica, 16° Congreso SAM-CONAMET, Córdoba, Argentina, 22-25 noviembre 2016.
- [33] R. Comín, M. Cid, L. Grinschpun, C. Oldani, N. Salvatierra. Titanium-Hydroxyapatite composites sintered at low temperature for tissue engineering: in vitro cell support and biocompatibility. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials* 2017 Feb 21:0. doi: 10.5301/jabfm.5000340

- [34] L. Vasconcellos, D. Leite, F. Nascimento, G. Vasconcellos, M. Graça, Y. Carvalho, A. Cairo, "Porous titanium for biomedical applications – An experimental study on rabbits", *Med. oral patol. oral cir. Bucal*, vol. 2, pp. E407-412, 2010.
- [35] E. Spoerke, N. Murray, H. Li, C. Brison, D. Dunand, S. Stupp, "A bioactive titanium foam scaffold for bone repair", *Acta Biomaterialia* vol. 1, no. 5, pp. 523-533, 2005.
- [36] "Guía de procedimientos y métodos de esterilización y desinfección para establecimientos de salud" *Ministerio de Salud de la Nación*.
http://www.msal.gob.ar/pngcam/resoluciones/msres387_2004.pdf
- [37] S. Nishiguchi, H. Kato, M. Neo, M. Oka, H. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura, "Alkali and heat-treated porous titanium for orthopedic implants", *J. Biomed. Mat. Res.* vol. 54, pp. 198-208, 2001.
- [38] A. Ponche, M. Bigerelle, K. Anselme; "Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part I: Physico-chemical effects", *Proc Inst Mech Eng H J Eng Med*, vol. 224, no 12, pp. 1487-1507, 2010.
- [39] A. Brentel, L. Vasconcellos, M. Oliveira, M. Graça, G. Vasconcellos, C. Cairo, Y. Carvalho, "Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface", *J. appl. oral sci.* vol.14, pp. 213-218, 2006.
- [40] P. Faria, A. Carvalho, D. Felipucci, C. Wen, L. Sennerby, L. Salata, "Bone formation following implantation of titanium sponge rods into humeral osteotomies in dogs: a histological and histometrical study", *Clin. implant dent. rel. res.* vol. 12, pp. 72-79, 2010.
- [41] T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura, M. Oka, "Transmission electron microscopy observations at the interface of bone and four types of calcium phosphate ceramics with different calcium/phosphorus molar ratios", *Biomaterials*, vol. 16, no 14, pp. 1101-1107, 1995.