

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES



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



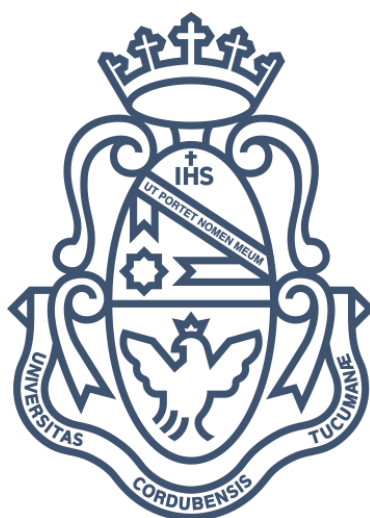
Bianchi, Julián

Maturana, Stefanía Ayelén

Año 2016

Proyecto Integrador

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



Alumnos:

Bianchi, Julián
Matrícula: 200304189

Maturana, Stefanía Ayelén
Matrícula: 35556381

Director:

Ing. Grinschpun, Luciano Salvador

Co-Directores:

Dra. Suarez, Marta Magdalena
Dra. Rivarola Angélica



Ingeniería
Biomédica

Córdoba, Diciembre de 2016

Agradecimientos

Agradecemos a nuestros directores Ing. Luciano Grinschpun, Dra. Marta Suarez y Dra. Angélica Rivarola por su dedicación, predisposición y acompañamiento durante todo el desarrollo del proyecto.

A los miembros del Laboratorio de Materiales y del Laboratorio de Fisiología Animal de la FCEFyN por asesorarnos, guiarnos y permitirnos realizar la práctica de nuestro trabajo allí. En especial al Dr. Oldani por sus consejos y su constante interés en cada etapa.

A la Dra. Romina Comín, al encargado del Laboratorio del Vidrio de nuestra facultad, a Mariano y Emiliano por su colaboración desinteresada en distintas instancias.

A nuestras familias por su confianza y apoyo constante.

A todos, muchísimas gracias.

Resumen

Las técnicas comúnmente empleadas para regenerar y reparar el tejido óseo dañado, cuando su capacidad de auto-regeneración es superada por el grado de lesión, tienen grandes limitaciones debido a causas tales como: el rechazo inmunológico, las complicaciones de una intervención quirúrgica, la incapacidad de proporcionar una recuperación total de la funcionalidad del tejido o el elevado costo económico.

Dentro del ámbito de investigación de la regeneración ósea, actualmente, una de las líneas de estudio que se desarrolla es la creación de distintos tipos de materiales compuestos que promuevan la regeneración del tejido al incorporarlos en la zona de lesión.

La evaluación de los biomateriales utilizados para tratar la pérdida de tejidos requiere la realización de ensayos de distinta índole que pueden ser realizados *in vivo* o *in vitro* siguiendo la normativa de los entes reguladores de cada país.

En el presente trabajo se propone la sistematización de un modelo experimental para evaluar Titanio poroso y Titanio con Hidroxiapatita, comparándolo con Titanio denso, como material de reemplazo en un modelo animal, *in vivo*. Para ello, basándose en la normativa competente, implementando mejoras en las técnicas e instrumentación utilizadas, aumentando el número de sujetos experimentales e incorporando otro tipo de biomaterial, se elaboraron piezas de titanio denso, titanio poroso y titanio con hidroxiapatita mediante la técnica de Pulvimetalurgia desarrollada en el Laboratorio de Materiales de la FCEfyN. Las probetas fabricadas fueron implantadas en 24 fémures de ratas, siguiendo el modelo experimental del Laboratorio de Fisiología Animal.

Las piezas para sustitución fueron estudiadas metalográficamente previo a la implantación. La evaluación de la interfase implante-hueso, se llevó a cabo mediante estudio peri-implantar con radiografías, análisis macroscópico, microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM) sumado a la técnica de espectrometría de energía dispersiva de rayos X (EDS). En todos ellos se comprobó presencia de tejido óseo nuevo y ausencia total de tejido fibroso. Además, los resultados de los estudios se utilizaron para el cálculo del porcentaje del perímetro del implante en contacto con tejido óseo (BIC) y determinación de la calidad del hueso formado mediante la relación de elementos Ca/P.

Finalmente, para evaluar el desempeño en cuanto a osteoconductividad y osteoinducción de los distintos tipos de compuestos para implantes, y a su vez determinar si las diferencias encontradas entre los porcentajes de BIC de

los mismos eran estadísticamente significativos, se realizaron estudios con estadísticos descriptivos, prueba ANOVA y prueba t para muestras apareadas.

Los resultados obtenidos en la evaluación de elementos químicos, en las relaciones Ca/P y en el porcentaje de contacto hueso-implante indicaron que hubo una mayor biocompatibilidad en las piezas de "Ti poroso" y de "Ti - Hidroxiapatita" comparadas con las de Ti Denso, aunque no estadísticamente significativo. En ambos casos se evidenció una tendencia de mayor inducción a la formación de matriz ósea logrando crecimiento de hueso compacto en los poros internos e interconectados de todos los implantes y mostrando, además, indicios de mejoras en la calidad de la constitución ($>Ca/P$). Como conclusión se puede advertir que los implantes en tejido óseo de Titanio Poroso o Titanio con Hidroxiapatita, tienen mejor performance que el Titanio Denso. La falta de significación estadística se corregiría con un aumento del "n" muestral.

Abstract

The most commonly techniques used in order to regenerate and fix the bone tissue, when their self-regeneration capacity is overcome by the degree of injury, submit major limitations because of: an immune rejection, a surgical complications, a disability for a fully recovery of the functionality of the tissue or a high cost.

Currently, inside the research area of osseous regeneration, the creation of different tips of composite materials that promote tissue regeneration by incorporating at the site of injury was developed as a line of study.

The evaluation of the biomaterials used for the treatment of the loss of tissue demand the realization of different kind of tests that may be made *in vivo* or *in vitro*, following the regulations of the regulatory bodies of every country.

This paper proposes the systematization of an experimental model to assess porous Titanium and Titanium with Hydroxyapatite, in comparison with dense Titanium, as a replacement material in an animal model, *in vivo*. For this, pieces of dense Titanium, of porous Titanium and Titanium with Hydroxyapatite were made using the powder metallurgy technique developed in the Laboratory of Materials FCEfyN; based on the appropriate normative, implementing improvement in the techniques and the instrumentation used, increasing the number of experimental subjects and incorporating other kind of biomaterial. The manufactured test pieces were implemented in 24 femur's rats, following the experimental model of the Laboratory of Animal Physiology.

The parts for replacement were studied in a metallographic way, earlier to the implementation. The assessment of the interfase implant-bone, was carried out by peri-implant X-ray, macroscopic analysis, optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM) coupled with spectrometry technique energy dispersive X-ray (EDS) study. In all of them, the presence of new bone tissue and a complete absence of fibrous tissue were proved. Also, the results of the studies were used to calculate the percentage of the perimeter of the implant connected with bone tissue (BIC) and to determine the quality of bone formed by the ratio of Ca / P elements.

Finally, studies with statistical descriptions, ANOVA test y t test for paired samples were performed to assess the performance in terms of osteoconductive and osteoinductive of different types of compounds for implants, and at the same time, to identify if the differences founded between the percentages of BIC of them were statistically significant.

The results obtained in the evaluation of chemical elements, in the Ca / P ratios and in the percentage, and entage in the contact bone-tissue indicated that there was higher biocompatibility in the parts of "porous Ti" and "Ti - Hydroxyapatite" compared with those of Ti Denso, although not statistically significant. In both

cases a trend of higher induction to bone matrix formation was evident achieving growth of compact bone in the internal pores interconnected all implants and also showing signs of improvement in the quality of the constitution ($> \text{Ca} / \text{P}$). In conclusion it can be observed that the implants in bone tissue Titanium or Titanium Porous Hydroxyapatite have better performance than Titanium Denso. The lack of statistical significance was corrected with an increase of "n" sample.

Contenido

Proyecto Integrador	- 1 -
Agradecimientos	- 2 -
Resumen	- 3 -
Contenido.....	1
Índice de Ilustraciones.....	4
Índice de Tablas	8
Introducción.....	9
Capítulo 1: Marco teórico	11
1.1 Marco legal y regulatorio para productos médicos implantables.....	11
1.1.1 Laboratorios acreditados para ensayos de biocompatibilidad	14
1.2 Dispositivos médicos para reemplazo óseo	14
1.3 Tejido óseo	15
1.3.1 Osteogénesis, remodelado y reparación ósea.....	16
1.4 Biomateriales para reparación y regeneración ósea	19
1.4.1 El Titanio como reemplazo óseo.....	20
1.4.2 Tratamiento superficial en implantes de Ti	21
1.4.3 Titanio e Hidroxiapatita	22
1.5 Pulvimetalurgia aplicada al desarrollo de Implantes quirúrgicos.....	23
1.6 Estudios del desempeño de biomateriales realizado en animales...	24
1.7 Interfase Hueso-Implante.....	26
1.7.1 Calidad de la interfase Hueso-Implante.....	27
1.8 Métodos evaluativos de la osteointegración	28
1.8.1 Radiografías	28
1.8.2 Análisis Histológico.....	30
1.8.3 Evaluaciones mediante Microscopía Electrónica de barrido	
(SEM).....	30
1.9 Estudios estadísticos	31
Objetivos	33
Objetivos Generales.....	33
Objetivos Específicos.....	33

Capítulo 2: Materiales y Métodos	34
2.1 Elección del modelo animal	34
2.1.1 Usos y cuidados	35
2.2 Diseño y fabricación de la matriz	35
2.3 Fabricación de “Implantes en verde”	38
2.3.1 Mezcla de polvos- Primeras pruebas.....	38
2.3.2 Determinación de dimensiones y pesos de las piezas	39
2.4 Sinterizado	40
2.4.1 Prototipos de soportes para sinterizado	41
2.5 Análisis metalográfico	43
2.6 Limpieza por ultrasonido y esterilización.....	44
2.7 Procedimiento quirúrgico	45
2.7.1 Prueba preliminar	45
2.7.2 Sujetos experimentales	46
2.7.3 Materiales usados en la cirugía	46
2.7.4 Cirugía	47
2.7.5 Postoperatorio mediato e inmediato	48
2.8 Sacrificio	49
2.9 Primera valoración de las muestras	50
2.9.1 Radiografías	50
2.9.2 Análisis con Lupa estereoscópica.....	50
2.10 Preparado de muestras para Microscopía Electrónica.....	51
2.11 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Análisis Elemental (EDS)	53
2.11.1 Medición de BIC	54
2.11.2 Análisis de EDS y relación Ca/P	54
2.12 Evaluación mediante análisis estadístico.....	55
Capítulo 3: Resultados	57
3.1 Piezas sinterizadas	57
3. 2 Resultados de Metalografía	58
3.3 Conclusiones de la prueba preliminar	60
3.4 Resultados del post-operatorio	60
3.5 Muestras extraídas.....	62
3.6 Resultados de Placas Radiográficas.....	64

3.7 Análisis mediante Lupa Estereoscópica.....	66
3.8 Microscopía Electrónica de Barrido y Análisis elemental EDS.....	68
3.8.1 Medición de BIC	70
3.8.2 Relación Ca/P.....	70
3.9 Datos estadísticos.....	72
3.9.1 Valores estadísticos descriptivos.....	72
3.9.2 Prueba ANOVA y t de Student para muestras apareadas..	75
Capítulo 4: Discusiones.....	78
4.1 Discusión sobre la fabricación de piezas implantables	78
4.2 Discusión sobre el modelo experimental.....	79
4.3 Discusión de la evaluación de Ti denso, Ti poroso y Ti e Hidroxiapatita	
80	
Capítulo 5: Conclusiones	83
Bibliografía y Referencias	84
Anexos	94
Anexo N° 1: Ensayos de biocompatibilidad según Norma ISO 10993.....	95
Anexo N° 2: Planos de fabricación e Imágenes de matriz de Acero.....	97
Anexo N° 3: Fabricación de pieza “en verde”	103
Anexo N° 4: Mediciones sobre pruebas piloto	104
Anexo N° 5: Procedimiento quirúrgico.....	106
Anexo N° 6: placas radiográficas.....	110
Anexo N° 7: Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	116
Anexo N° 8: Análisis Elemental (EDS)	130
Anexo N° 9: Valores de porcentajes de BIC.....	148
Anexo N° 10: Valores Estadísticos.....	150

Índice de Ilustraciones¹

Ilustración 1: Ciclo de vida del producto médico	12
Ilustración 2: Conformación del tejido óseo a nivel microscópico.....	16
Ilustración 3: Remodelado óseo	17
Ilustración 4: Formación de hematoma y callo óseo tras lesión o fractura	18
Ilustración 5: Propiedades mecánicas del Ti puro para implantes quirúrgicos .	20
Ilustración 6: Ventajas y Desventajas de la Pulvimetalurgia.....	24
Ilustración 7: Pruebas de compatibilidad biológica	25
Ilustración 8: Interfase hueso-implante.....	26
Ilustración 9: Media de valores de diámetro de fibrillas de colágeno en ratas..	29
Ilustración 10: Diseño de matriz en software.....	36
Ilustración 11: Matriz con sus cuatro partes	37
Ilustración 12: Ciclo térmico aplicado a piezas de Ti y de Ti-HA	40
Ilustración 13: Ciclo térmico aplicado a piezas de Ti-P	41
Ilustración 14: Canastilla de la cámara.....	42
Ilustración 15: Soporte de Acero Inoxidable	42
Ilustración 16: Vaina de cerámica con soporte de Al.....	43
Ilustración 17: Estuches de cuarzo.....	43
Ilustración 18: Pulido de muestra para metalografía	43
Ilustración 19: Pieza de Ti-HA sometida a lavado ultrasónico.....	44
Ilustración 20: Marcaje	47
Ilustración 21: Muestras en formol	49
Ilustración 22: Deshidratación de las muestras	51
Ilustración 23: Inclusión de las muestras.....	52
Ilustración 24: Muestras desbastadas y pulidas	53
Ilustración 25: Muestra de 14mm diám. x 6mm alto	53
Ilustración 26: Medición de perímetros en muestra 44dP.....	54
Ilustración 27: Pieza de Ti denso	57
Ilustración 28: Pieza de Ti poroso	57
Ilustración 29: Pieza de Ti-HA.....	58
Ilustración 30: Pieza de Ti-HA con ciclo térmico hasta 800 °C.....	59
Ilustración 31: Ti-P sometido a ciclo térmico hasta 800°C.....	59
Ilustración 32: Pieza de Ti denso sinterizada a 800 °C	59
Ilustración 33: Prueba de trepanación e inserción del implante	60
Ilustración 34: Muestra 55 derecha (Ti-HA).....	63
Ilustración 35: Muestra 60 izquierda (Ti)	63
Ilustración 36: Muestra 45dHA	64
Ilustración 37: Muestra 45iD.....	64
Ilustración 38: Muestra 46iD.....	65

¹ Las referencias de las Ilustraciones y Tablas se realizaron según el instructivo publicado en http://ingbiomedica.weebly.com/uploads/3/2/2/6/32264937/plantilla_dos_alumnos.dot. Fecha de acceso 15/11/2016.

Ilustración 39: Muestra 50iD.....	65
Ilustración 40: Fotomicrografía 5iD.....	67
Ilustración 41: Fotomicrografía 46dP.....	67
Ilustración 42: Fotomicrografía 5dHA.....	67
Ilustración 43: Ejemplo EDS-SEM: muestra 50 dHA.....	70
Ilustración 44: Diagrama de distribución elemental: muestra 50 dHA.....	71
Ilustración 45: Diagrama en caja Ti denso-grupo 1 vs Ti poroso.....	72
Ilustración 46: Diagrama en caja Ti denso-grupo 2 vs Ti-HA.....	73
Ilustración 47: Prueba ANOVA.....	75
Ilustración 48: Prueba t - muestras apareadas Ti-D1 vs Ti-P.....	76
Ilustración 49: Prueba t - muestras apareadas Ti-D2 vs Ti-HA.....	76
Ilustración 50: Plano "Conjunto Matriz".....	97
Ilustración 51: Plano "Disco".....	98
Ilustración 52: Plano "Hembra".....	99
Ilustración 53: Plano "Vástago".....	100
Ilustración 54: Plano "Porta".....	101
Ilustración 55: Cilindro base.....	102
Ilustración 56: Cilindro base en vista inferior.....	102
Ilustración 57: Punzón.....	102
Ilustración 58: Llenado de la matriz con polvo.....	103
Ilustración 59: Ayuda manual para el desmolde.....	103
Ilustración 60: Desmolde de la pieza "en verde".....	103
Ilustración 61: Pieza de 1,6 mm de diámetro y 1,4 mm de alto.....	104
Ilustración 62: Pieza de 1,6 mm de diámetro y 1,5 mm de alto.....	104
Ilustración 63: Pieza de 1,9 mm de diámetro y 1,8 mm de alto.....	105
Ilustración 64: Preparado de elementos necesarios para la cirugía.....	107
Ilustración 65: Trepanación del fémur.....	108
Ilustración 66: Colocación de pieza en el orificio realizado, sin ejercer presión.....	109
Ilustración 67: Post-operatorio en ambiente climatizado.....	109
Ilustración 68: 4 IZQUIERDA (Ti).....	110
Ilustración 69: 4 DERECHA (Ti-P).....	110
Ilustración 70: 5 IZQUIERDA (Ti).....	110
Ilustración 71: 5 DERECHA (Ti-HA).....	110
Ilustración 72: 6 IZQUIERDA (Ti).....	111
Ilustración 73: 40 IZQUIERDA (Ti).....	111
Ilustración 74: 40 DERECHA (Ti-HA).....	111
Ilustración 75: 44 IZQUIERDA (2Ti).....	112
Ilustración 76: 44 DERECHA (Ti-P).....	112
Ilustración 77: 45 IZQUIERDA (2Ti).....	112
Ilustración 78: 45 DERECHA (Ti-HA).....	112
Ilustración 79: 46 IZQUIERDA (Ti).....	113
Ilustración 80: 46 DERECHA (Ti-P).....	113

Ilustración 81: 50 IZQUIERDA (Ti)	113
Ilustración 82: 50 DERECHA (Ti-HA)	113
Ilustración 83: 54 IZQUIERDA (Ti)	114
Ilustración 84: 54 DERECHA (Ti-P).....	114
Ilustración 85: 55 IZQUIERDA (Ti)	114
Ilustración 86: 55 DERECHA (Ti-HA)	114
Ilustración 87: 56 IZQUIERDA (Ti)	115
Ilustración 88: 56 DERECHA (2Ti-P).....	115
Ilustración 89: 60 IZQUIERDA (2Ti)	115
Ilustración 90: 60 DERECHA (Ti-HA)	115
Ilustración 91: SEM - Muestra 4dP (50X)	116
Ilustración 92: SEM - Muestra 4dP (100X)	116
Ilustración 93: SEM - Muestra 5iD (50X)	117
Ilustración 94: SEM - Muestra 5iD (391X)	117
Ilustración 95: SEM - Muestra 5dHA (50X).....	118
Ilustración 96: SEM - Muestra 6iD (50X)	118
Ilustración 97: SEM - Muestra 6iD (100X)	119
Ilustración 98: SEM - Muestra 44iD (33X)	119
Ilustración 99: SEM - Muestra 44iD (50X)	120
Ilustración 100: SEM - Muestra 44dP (50X)	120
Ilustración 101: SEM - Muestra 44dP (100X)	121
Ilustración 102: SEM - Muestra 45iD (50X)	121
Ilustración 103: SEM - Muestra 45iD (33X)	122
Ilustración 104: SEM - Muestra 46iD (50X)	122
Ilustración 105: SEM - Muestra 46dP (40X)	123
Ilustración 106: SEM - Muestra 46dP (100X)	123
Ilustración 107: SEM - Muestra 50iD (50X)	124
Ilustración 108: SEM - Muestra 50dHA (50X).....	124
Ilustración 109: SEM - Muestra 54iD (50X)	125
Ilustración 110: SEM - Muestra 54dP (50X)	125
Ilustración 111: SEM - Muestra 54dP (100X)	126
Ilustración 112: SEM - Muestra 55iD (50X)	126
Ilustración 113: SEM - Muestra 55dHA (35X).....	127
Ilustración 114: SEM - Muestra 56dP (50X)	127
Ilustración 115: SEM - Muestra 56dP (100X)	128
Ilustración 116: SEM - Muestra 60iD (50X)	128
Ilustración 117: SEM - Muestra 60dHA (50X).....	129
Ilustración 118: EDS-Muestra 4dP	130
Ilustración 119: EDS-Muestra 5iD	131
Ilustración 120: EDS-Muestra 5dHA.....	132
Ilustración 121: EDS-Muestra 6iD	133
Ilustración 122: EDS-Muestra 44iD	134
Ilustración 123: EDS-Muestra 44dP	135
Ilustración 124: EDS-Muestra 45iD	136

Ilustración 125: EDS-Muestra 46iD	137
Ilustración 126: EDS-Muestra 46dP	138
Ilustración 127: EDS-Muestra 50iD	139
Ilustración 128: EDS-Muestra 50dHA.....	140
Ilustración 129: EDS-Muestra 54iD	141
Ilustración 130: EDS-Muestra 54dP	142
Ilustración 131: EDS-Muestra 55iD	143
Ilustración 132: EDS-Muestra 55dHA.....	144
Ilustración 133: EDS-Muestra 56dP	145
Ilustración 134: EDS-Muestra 60iD	146
Ilustración 135: EDS-Muestra 60dHA.....	147

Índice de Tablas

Tabla 1: Datos quirúrgicos.....	48
Tabla 2: Pasos para la preparación de muestras	52
Tabla 3: Seguimiento post-operatorio	61
Tabla 4: Descripción de muestras luego de la extracción	63
Tabla 5: Análisis de placas radiográficas	66
Tabla 6: Resultados de fotomicrografías con lupa estereoscópica	68
Tabla 7: Evaluación de interfaz según BS-SEM.....	69
Tabla 8: Modelo de evaluación histológica según ISO 10993-6.....	95
Tabla 9: Elección de ensayos de biocompatibilidad según naturaleza y tiempo del contacto (ISO 10993-1)	96
Tabla 10: Valores de BIC Ti denso.....	148
Tabla 11: Valores de BIC Ti poroso	148
Tabla 12: Valores de BIC Ti e Hidroxiapatita.....	148
Tabla 13: Valores de Ca y P para muestras de titanio denso.....	149
Tabla 14: Valores de Ca y P para muestras de titanio poroso	149
Tabla 15: Valores de Ca y P para muestras de titanio e hidroxiapatita	149
Tabla 16: Valores estadísticos descriptivos para Ti denso-grupo 1.....	150
Tabla 17: Valores estadísticos descriptivos para Ti poroso... ..	150
Tabla 18: Valores estadísticos descriptivos para Ti denso-grupo2	151
Tabla 19: Valores estadísticos descriptivos para Ti e hidroxiapatita.....	151
Tabla 20: Prueba ANOVA.....	152
Tabla 21: Prueba t para muestras apareadas	152

Introducción

La sistematización es la interpretación crítica de una o varias experiencias que, a partir de su ordenamiento y reconstrucción, descubre o explicita la lógica del proceso realizado, los factores que han intervenido en dicho proceso, cómo se han relacionado entre sí y por qué lo han hecho de ese modo.

La idea de sistematización se relaciona con los espacios científicos de investigación porque todo proceso investigativo debe contar con una estructura o sistema de pasos que respetar y seguir a fin de obtener resultados particulares.

En el presente Proyecto Integrador se evalúan y ajustan los pasos seguidos en el diseño de Boezio-Amietta [1]. En dicho trabajo se delineó e implementó un modelo experimental *in vivo* para evaluar Titanio como material de reemplazo óseo, aquí se ejecutaron cambios tendientes a lograr una sistematización del ensayo de manera tal de que pueda ser reproducible y aplicable para cualquier biomaterial de reemplazo óseo. Además se buscó realizar un análisis de datos de manera tal que se pueda contar para el futuro con resultados de referencia y basados en una correcta estadística.

Un requisito fundamental para sistematizar un modelo experimental es que el mismo cumpla con la normativa vigente y exigida por el centro regulador pertinente. Los fabricantes e investigadores del sector tienen la responsabilidad legal y el compromiso social de garantizar seguridad y eficacia en los productos médicos incluyendo los biomateriales, por lo cual, todos los ensayos que recaen sobre ellos deben estar acreditados y certificados.

Como primer paso en la sistematización se estudió el encuadre legal y regulatorio para luego poder comparar y realizar, en lo posible, cada etapa bajo norma con el objetivo final de poder lograr un modelo experimental sistemático, eficiente y válido.

Se diseñó y se fabricó una nueva matriz para salvar los errores cometidos en el acabado y en el tamaño de las piezas del modelo anterior [61]. Seguidamente, con pulvimetalurgia se crearon las probetas, se estudiaron mediante metalografía y por último se limpiaron con ultrasonido y esterilización.

La implantación se realizó en 12 ratas macho de la cepa Wistar, las cuales recibieron dos tipos de piezas cada una, siendo las patas izquierdas el “control” y las derechas el “problema”. Luego de 4 semanas pertenecientes al postoperatorio, se sacrificaron y extrajeron los fémures para su estudio.

La evaluación de la interfase hueso-implante se llevó a cabo de manera macroscópica y microscópica, de manera tal que sus resultados nos permitie-

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

ron sacar conclusiones prematuras y analizarlas luego mediante estadística para finalizar.

Capítulo 1: Marco teórico

En este punto se desarrollan las bases que dan sustento y facilitan la comprensión del presente proyecto integrador, así como el estado actual del tema.

Se analizan primeramente el encuadre legal y regulatorio presente en nuestro país o exigido por el mismo para las prácticas y ensayos *in vivo* en el área de los productos médicos implantables.

Luego se propone adentrar en el tema de biomateriales para implantes óseos, estudiando consecutivamente la estructura y biología ósea, fundamentando los procesos regenerativos, diferenciándolos de los reparativos y, seguidamente evaluando las técnicas y materiales utilizados hasta el momento con el fin de obtener una adecuada regeneración de hueso.

Por último, se explican brevemente las técnicas a utilizar para la evaluación de la osteointegración y para contrastar resultados mediante la estadística.

1.1 Marco legal y regulatorio para productos médicos implantables

El análisis de seguridad y control de los equipos médicos se basan en la información recogida en todas las etapas del ciclo de vida, donde participan una amplia y compleja red social de instituciones, que engloba a especialistas de diferentes profesiones, tales como: reguladores, fabricantes, distribuidores, investigadores y evaluadores (físicos, químicos, biólogos, bioingenieros), médicos y pacientes (Vea Ilustración 1).

Las distintas agencias reguladoras dedicadas a la autorización de productos sanitarios en cada país, exigen que se lleve a cabo una evaluación exhaustiva sobre cada uno de ellos antes de la certificación [2].

Para los equipos médicos implantables tanto él como los materiales utilizados para su fabricación como su diseño, deben cumplir requisitos de resistencia y composición que los hagan aptos para el uso. Los requerimientos que deben satisfacer no son sólo físicos y mecánicos, sino también de índole biológica, química y biomecánicas. Se debe satisfacer estrictamente para todos los implantes biocompatibilidad, biofuncionalidad y bioestabilidad.

Estos datos de seguridad se pueden obtener mediante ensayos de acuerdo a ciertas recomendaciones, incluyendo documentos de orientación como los elaborados por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO), la FDA (EEUU), BS (Inglaterra), entre otros.

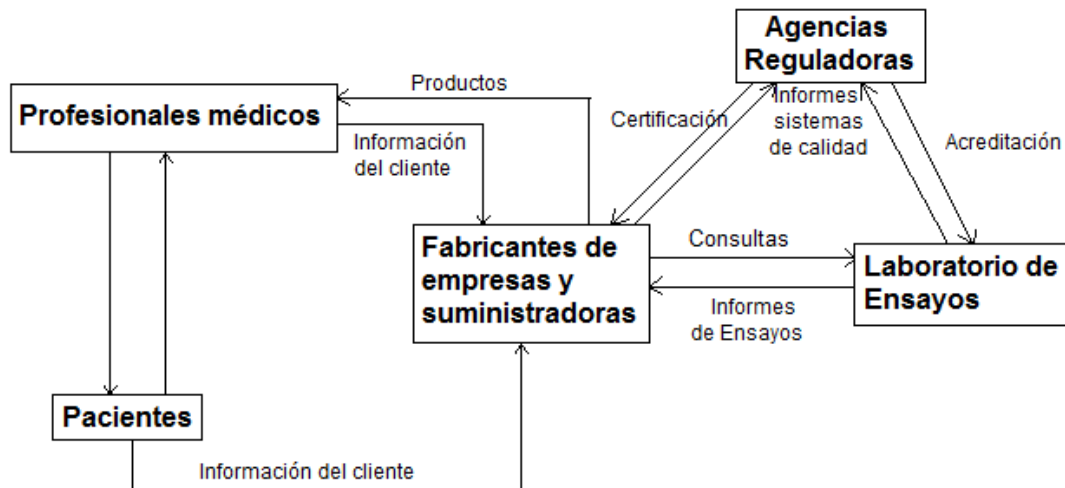


Ilustración 1: Ciclo de vida del producto médico²

En Argentina, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) es quién garantiza que los medicamentos, alimentos y dispositivos médicos a disposición de los ciudadanos posean eficacia (que cumplan su objetivo terapéutico, nutricional o diagnóstico), seguridad (alto coeficiente beneficio/riesgo) y calidad (que respondan a las necesidades y expectativas de la población). Para ello, se encarga de llevar adelante los procesos de autorización, registro, normatización, vigilancia y fiscalización de los productos de su competencia en todo el territorio nacional [3, 4].

De este modo, en lo que respecta a productos médicos, ANMAT establece disposiciones con el objetivo de que el fabricante pueda clasificarlo y luego “orientarse” en la fabricación y trazabilidad del mismo. Las disposiciones establecen requisitos a cumplir a la hora de presentar el producto médico al ANMAT para su certificación; en ellas se pide que cada paso involucrado (diseño, elaboración, ensayos, entre otros) concuerde con la norma internacional de competencia.

En el caso de dispositivos médicos “implantables”, para lograr su certificación y la de la empresa fabricante, se deben llevar a cabo todos los tipos de ensayos que comprueben el cumplimiento de los requisitos previstos por los reglamentos técnicos específicos MECORSUR que resultaren aplicables, emitidos por laboratorios oficiales o privados acreditados por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA).

Dentro de todos los tipos de ensayos que deben realizarse sobre productos implantables (mecánicos, químicos, físicos, de envejecimiento, etc), las

² Ilustración adaptada de Mayelín Guerra Bretaña R. Gestión de la calidad de los materiales y dispositivos médicos: requisitos, normativa y regulaciones, Ciudad de La Habana: Editorial Universitaria 2009; ISBN 978-959-16 1144-4: 121 p.

“pruebas biológicas” son las más importantes e implican un estudio de biocompatibilidad [5]. El conjunto de Normas internacionales que se ocupan de regular los ensayos de biocompatibilidad son las ISO 10993.

La Norma ISO 10993 (Biological evaluation of medical devices, 1991) consta de 20 partes de las cuales en la primera [6] se establece que, para una evaluación completa de seguridad biológica, se deben clasificar los dispositivos de acuerdo con la naturaleza y la duración de su contacto con los tejidos humanos cuando está en uso. De esta manera, en función del tiempo de exposición y la forma de contacto se presenta una “Matriz de Selección de Ensayos” (Vea Anexo N° 1, tabla n° 9) que indica las pruebas a realizar para la evaluación de biocompatibilidad, a saber: citotoxicidad, sensibilización, irritación cutáneas o intracutáneas, toxicidad sistemática, toxicidad crónica, genotoxicidad, Implantación hueso o Músculo y hemocompatibilidad. Los datos biológicos se clasifican en: superficie, implante o dispositivo externo.

Para la prueba de dispositivos destinados a actuar como reemplazos óseos, según el tiempo de contacto con el tejido, si supera los treinta días es indispensable un ensayo de “implantación”, que es el corresponde al modelo experimental desarrollado en el presente proyecto integrador. Este tipo de ensayo se encuentra regulado por la ISO 10993-6 [7].

Otras de las disposiciones de ANMAT a seguir además de las normas internacionales, son:

- **Disposición 2318/02:** Reglamento Técnico Mercosur de Registro de Productos Médicos [8]. Establece las definiciones de “producto médico implantable”, “producto médico quirúrgicamente invasivo” y su conjunto se somete a una regla que lo divide en clases. En el caso de dispositivos invasivos de uso prolongado de tipo quirúrgico, la regla 8 lo ubica en la CLASE III.
- **Disposición 2303/14:** Sistema de Trazabilidad de Productos Médicos [9], basado en ISO 14630: Implantes quirúrgicos no activos — Requisitos generales [10].
- **Disposición 3266/13:** “Reglamento Técnico MERCOSUR de Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Médicos y Productos para Diagnóstico de uso In Vitro” [11]. Describe las buenas prácticas de fabricación (BPF) para métodos y controles usados en el diseño, compras, fabricación, envasado, rotulado, almacenamiento, distribución, instalación y asistencia técnica de los productos médicos y productos para diagnóstico de uso in vitro.

1.1.1 Laboratorios acreditados para ensayos de biocompatibilidad

Actualmente en Argentina, algunos de los laboratorios que prestan servicios a empresas y universidades para la realización de ensayos biológicos son:

- CNEA (Comisión Nacional de Energía Atómica);
- BioAplicada S.A., CABA;
- Laboratorio de Biocompatibilidad, FCEFyN, Córdoba;
- Laboratorios de CONICET

En todos ellos, se llevan a cabo estudios experimentales que incluyen citotoxicidad (ISO 10993-5), genotoxicidad (ISO 10993-3), hemocompatibilidad (ISO 10993-4), irritación (ISO 10993-10), toxicidad sistémica, entre otros, pero no se encontró ningún establecimiento que realice el ensayo del cual trata el presente proyecto integrador que es la “implantación” (ISO 10993-6).

1.2 Dispositivos médicos para reemplazo óseo

Una de las aplicaciones más antiguas de dispositivos en el cuerpo humano está relacionada con su empleo en la sutura y cierre de heridas. En la actualidad, los más utilizados son para la reparación de fracturas como placas óseas, tornillos, barras, alambres, etc.

Los dispositivos para las fracturas óseas requieren un soporte mecánico adicional para la fijación del hueso. Tienen dos funciones fundamentales, desde un punto de vista biomecánico, para que el hueso pueda curar sin complicaciones: el mantenimiento de la continuidad y de la alineación de las partes fracturadas, y la transmisión de la fuerza durante la formación del callo óseo.

Existen diversos tipos de medios de osteosíntesis y pueden dividirse en dispositivos de fijación externa y dispositivos de fijación interna. Los fijadores externos consisten en clavos o tornillos metálicos de una longitud tal que puedan atravesar el hueso fracturado y los tejidos muscular y cutáneo. Implica el mantenimiento de un acceso a través del tejido cutáneo, donde existe el riesgo de infecciones. Los fijadores internos son implantados en contacto con el hueso del paciente y aseguran una remodelación ósea primaria rápida (sin formación de callo).

Para la elaboración de cualquier producto médico destinado a estar en contacto con tejido humano, como los mencionados anteriormente, se requiere

un estudio previo de la región biológica en cuestión, de su composición, estructuras y de las reacciones a diferentes estímulos.

1.3 Tejido óseo

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado que se caracteriza por su rigidez y gran resistencia, tanto a la tracción como a la compresión [12, 13, 14, 15]. Está compuesto por minerales, proteínas, agua, células y otras macromoléculas, que varían de acuerdo a las diferentes partes del esqueleto, edad del individuo o presencia de alguna enfermedad.

Más de un 99% en volumen de la matriz ósea se halla mineralizado por lo que posee dos tercios de sustancias inorgánicas (65%), constituida en su mayor parte por fosfato cálcico en forma de cristales de hidroxiapatita, y un tercio de sustancias orgánicas (30%) con el Colágeno tipo I como el más abundante (Vea Ilustración 2).

La matriz ósea es la responsable de las extraordinarias propiedades biomecánicas del hueso. Las fibras colágenas le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión.

Las principales células que conforman la fase orgánica del hueso son los Osteoblastos, Osteocitos y Osteoclastos.

Los **osteoblastos** son las células responsables de la formación de tejido óseo. Es una célula capaz de producir osteoide o matriz ósea. Produce colágeno de tipo I, además de proteínas constitutivas de la matriz extracelular ósea. Están localizados particularmente en el periosteo, una membrana que envuelve la parte externa de los huesos medianos y grandes y en la membrana endosteal, la cual se desarrolla sobre la pared interna del canal medular.

Una vez que los osteoblastos han alcanzado el final de su actividad y la matriz ósea se mineraliza, se convierten en **osteocitos**. Estas células representan la población de células vivientes estables con la tarea de mantener al hueso como un tejido vivo y mantener constante el equilibrio entre la fracción mineral y la orgánica.

Los **osteoclastos** son los principales causantes de la reabsorción ósea. Se caracterizan por ser células de gran tamaño que derivan de células pluripotenciales de la médula ósea, las cuales son precursoras hematopoyéticas. Se encuentran en regiones de reabsorción ósea llamadas lagunas de Howship. Estas células se unen a la superficie del hueso mediante proteínas encargadas de la unión, aíslan la zona a la cual se han unido y bajan el pH local incremen-

tando la solubilidad de los cristales de hidroxiapatita, para eliminar la fase mineral.

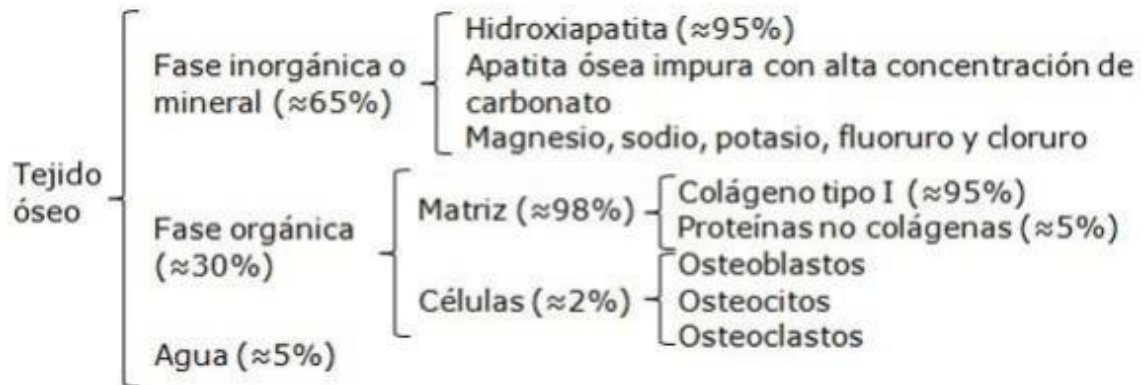


Ilustración 2: Conformación del tejido óseo a nivel microscópico³

Según la estructura macroscópica del tejido, existen dos tipos de hueso, el esponjoso o trabecular y el compacto o cortical. El hueso esponjoso posee travéculas y cavidades, se encuentra principalmente en la epífisis (extremos de huesos largos) pero también en huesos cortos como las vértebras.

1.3.1 Osteogénesis, remodelado y reparación ósea

La **osteogénesis** es el proceso de desarrollo del hueso, donde los osteoblastos segregan sustancias para formar el tejido osteoide, que posteriormente se convierte en denso y fibroso. Los cristales de fosfato de calcio son depositados en el tejido osteoide, cambiando así la matriz ósea. Los osteoblastos tienden a ser atrapados y al endurecerse se transforman en osteocitos.

La secreción de los osteoblastos no se convierte totalmente en fibras, sino que también hay una especie de cemento entre las fibras. Ambos, cemento y fibras, se combinan con los cristales de fosfato de calcio y los osteoides, formándose así el hueso.

El **Remodelado óseo** es un proceso que se lleva a cabo en todos los huesos del organismo a lo largo de toda la vida cuyos principales objetivos son mantener la fortaleza ósea y la homeostasis mineral. Este mecanismo comienza con la reabsorción de pequeñas porciones óseas debido a la actividad osteoclástica, luego se deposita matriz extracelular, que posteriormente se minera-

³ Ilustración extraída de Toribio Olea M. Síntesis y caracterización de nanopartículas de fosfato de calcio para la regeneración de tejidos. [Tesis Doctoral] Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona; 2014.

liza debido a la actividad osteoblástica (Vea Ilustración 3). El proceso puede reparar microfracturas, evitando su acumulación.

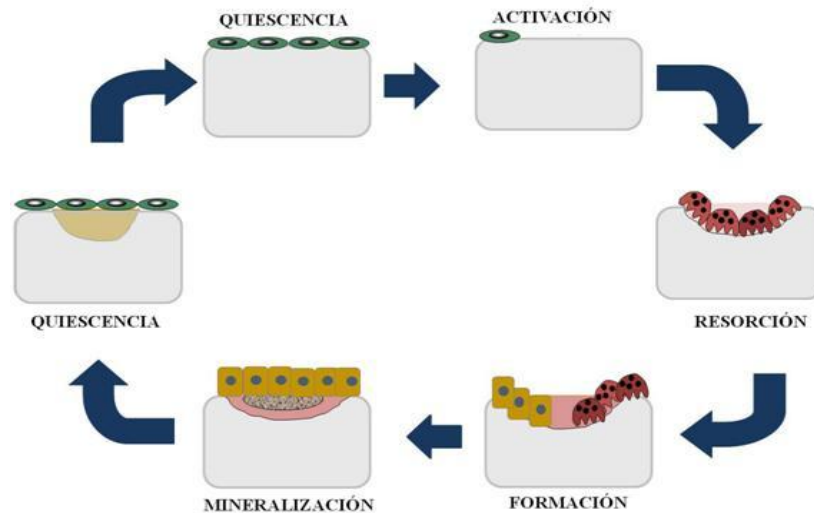


Ilustración 3: Remodelado óseo⁴

Reparación ósea: El tejido óseo es el único tejido capaz de repararse a sí mismo desde el momento en que se produce el daño y sin dejar cicatrices [16, 17]. La regeneración de defectos en el tejido óseo está influenciada por diferentes factores entre los cuales se pueden mencionar el tipo de hueso, es decir, si se trata de hueso cortical o trabecular, el lugar y el grado de severidad de la fractura o defecto, el grado de fijación durante el período de curación, la especie y edad del individuo.

Existen dos tipos de consolidación ósea:

- **Reparación ósea primaria:** ocurre cuando existe un contacto directo e íntimo entre los fragmentos de la fractura. No tiene formación de callo óseo (no se evidencia radiográficamente). Se logra con fijación rígida interna, ya que de ese modo el proceso normal de la reparación se acorta en una etapa. Se requiere de un contacto directo con la corteza y de una vascularización intramedular intacta. Además, la consolidación primaria requiere una inmovilización rígida para permitir a los frágiles vasos medulares recanalizar el hueso necrótico y atravesar la fractura.
- **Reparación ósea secundaria:** hay formación de callo óseo. Es la reparación clásica, la que se realiza fisiológicamente cuando un hueso se fractura y sólo se coloca en posición con medios or-

⁴ Ilustración extraída de SEBBM. [En línea]. 2014 [Fecha de acceso: 17 de julio de 2016]. URL disponible en: <http://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/305-especial-sobre-regeneracion-osea-3-articulos>.

topédicos, sin fijación rígida. Cuanta más movilidad tenga el foco de fractura, mayor tamaño tendrá el callo de fractura.

La primera etapa luego de la lesión (ruptura del hueso causada por fractura, o por algún procedimiento de implantación) abarca la inflamación, hemorragia y hemostasia la cual resulta en la formación de un coágulo de sangre o hematoma, que conlleva a la formación de un coágulo de fibrina y permanece usualmente por pocos días (Vea ilustración 4). Al cesar la circulación hay una falta de oxígeno, disminuye el pH y se da la necrosis (muerte celular) del tejido circundante por neutrófilos y macrófagos. En los días siguientes se produce la formación de un tejido de granulación (vasos, colágeno y células) y, cuando una red de tejido esponjoso, une los bordes externos, aparece un callo interno, y un callo externo de cartílago y hueso estabiliza los bordes externos. Luego, el cartílago del callo externo queda sustituido por hueso y los espolones del hueso esponjoso unen los extremos fracturados, eliminando y sustituyendo los fragmentos de hueso muerto y las zonas óseas cercanas a la rotura. Con el tiempo ocurre la remodelación del callo quedando pocos indicios de su existencia.

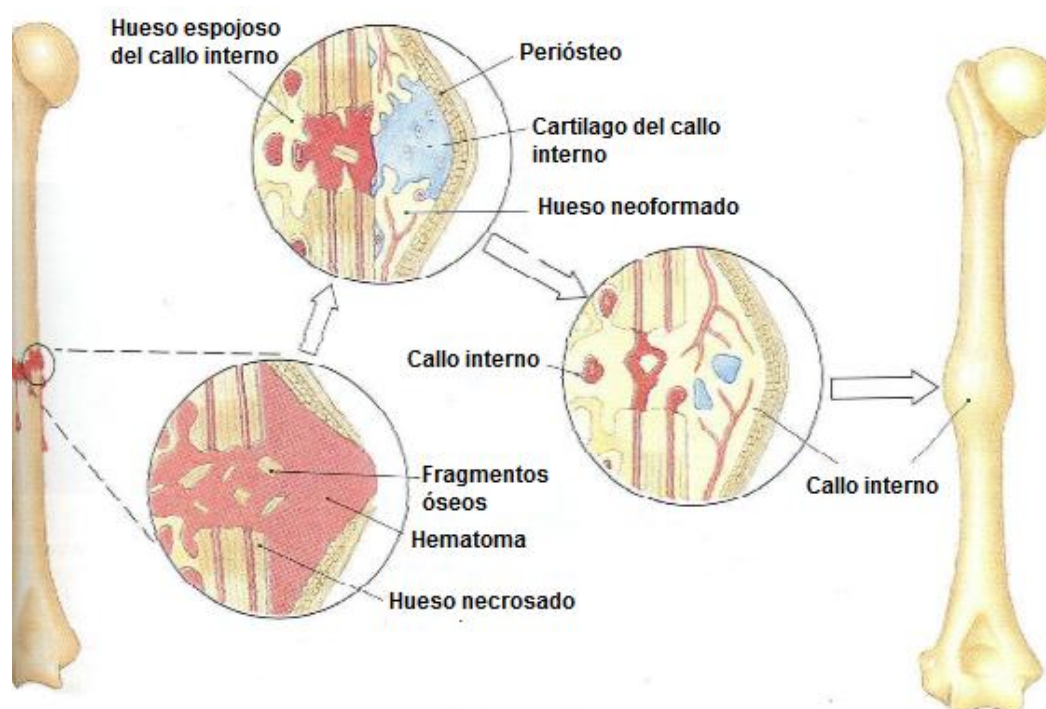


Ilustración 4: Formación de hematoma y callo óseo tras lesión o fractura⁵

⁵ Ilustración adaptada de Fisioterapia-Online. ¿Cómo cura nuestro organismo una fractura o fisura ósea? [En línea] 2009 [Fecha de acceso 26 de julio de 2016]. URL disponible en: <https://www.fisioterapia-online.com/articulos/como-cura-nuestro-organismo-una-fractura-o-fisura-osea>.

A **nivel celular**, la formación del nuevo hueso requiere la diferenciación de las células maduras y secretoras. Las células migrarán hasta alcanzar los bordes rotos del hueso o el implante en el lugar de la herida. Una vez que las células han alcanzado la superficie sólida, se inicia el proceso de síntesis de matriz extracelular en la superficie alcanzada. Finalmente se inicia el proceso de mineralización a partir de las proteínas adsorbidas en la superficie sólida, el cual es continuado por el crecimiento de cristales de fosfato de calcio, y el ensamblaje de las capas de matriz de colágeno con las mineralizadas, dando como resultado el nuevo hueso. Si la fractura es inestable, los osteoblastos se diferencian a condrocitos para formar una capa de colágeno que actúa como puente en los extremos de la fractura, constituyendo el callo blando. Este luego es calcificado para formar un callo óseo.

1.4 Biomateriales para reparación y regeneración ósea

Un Biomaterial es “un material ideado para interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o substituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” según la Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials (Segunda Conferencia para el Consenso de definiciones en Biomateriales), que tuvo lugar en el Reino Unido en 1992.

Entre los compuestos más importantes utilizados como biomateriales para la regeneración o reemplazo óseo se encuentran algunos metales y aleaciones, cerámicas, vidrios biológicos, polímeros naturales y sintéticos, así como fármacos biodegradables [18].

La formación ósea inducida por biomateriales, sea cual fuere el mecanismo que la provoca, refleja principalmente una modificación en el microambiente celular. En general, después del establecimiento de un tejido conjuntivo inmaduro y bien vascularizado, la formación ósea continúa con un reclutamiento, proliferación y diferenciación de células osteoblásticas con secreción de colágeno, proteínas de la matriz y mineralización posterior.

Autores como IKADA [14], ESTRADA [15] y BARRERE [16] describen que los materiales para implantes óseos deben observar las siguientes propiedades:

- **Biocompatibilidad:** integrarse al organismo hospedero sin que haya efectos citotóxicos, genotóxicos o respuesta inmune.
- **Biodegradabilidad:** degradarse (mediante hidrólisis) a tasas que sean lo más cercanas posibles a las tasas de formación de nuevo hueso.

- Resistencia y compatibilidad mecánica: resistir cargas mecánicas según sea la posición del tejido óseo que reemplaza. Las propiedades mecánicas como el módulo de elasticidad, la resistencia a la tracción, a la fractura, a la fatiga y porcentaje de elongación, entre otros, deben ser lo más cercanas posibles al hueso para evitar la osteopenia o "*stress shielding*".
- Osteoinductividad: Estimulación a la osteogénesis. Esto se logra al reclutar células madre mesenquimales y osteoprogenitoras.
- Osteoconductividad: el material provee un ambiente, estructura o matriz física apropiada para la aposición de hueso nuevo. Los materiales osteoconductivos son guías para el crecimiento óseo.
- Radiolucidez: diferenciarse radiográficamente con respecto al tejido donde se implantó.

1.4.1 El Titanio como reemplazo óseo

Dentro de los biomateriales de elección en el campo de la implantología y diseño de prótesis, se encuentra el titanio químicamente puro con sus óxidos de superficie, sus propiedades mecánicas (Vea Ilustración 5) y biocompatibilidad [19, 20, 21].

Propiedades	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Carga de rotura (MPa)	240	345	450	550
Límite elástico (0,2%) (MPa)	170	275	380	485
Elongación (%)	24	20	18	15
Estricción (%)	30	30	30	25

Ilustración 5: Propiedades mecánicas del Ti puro para implantes quirúrgicos⁶

⁶ Ilustración extraída de Gutiérrez Limón R. Materiales Biocompatibles, sus propiedades y características. [En línea]. 2008 [Fecha de acceso 19 de junio de 2016]. URL disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos-pdf5/materiales-biocompatibles-sus-propiedades-y-caracteristicas/materiales-biocompatibles-sus-propiedades-y-caracteristicas2.shtml>.

El factor fundamental que hace que el Ti sea el material **bioinerte** elegido para la fabricación de prótesis e implantes es que con él es posible alcanzar la **osteointegración** [22, 23, 24]. Ello está directamente vinculado con su excelente **biocompatibilidad**, la cual se caracteriza por la ausencia de corrosión y deterioro del material que puede conducir a respuestas inflamatorias indeseables, muerte del tejido circundante o la formación de trombos por efectos de coagulación sanguínea inesperada. Implica además que el organismo no genere respuestas inmunológicas indeseadas como el aumento en el número de anticuerpos, y que no existan fenómenos de mutación celular o aparición de células cancerígenas.

Algunos autores sitúan también al Ti como un material bioactivo, por el hecho de que sostienen que es capaz de generar la respuesta fenotípica del osteoblasto cuando éste está sobre su superficie, o porque es capaz por sí mismo de adsorber calcio y fósforo en su superficie, lo que permite la creación de un compuesto de fosfato de calcio de tipo cementante que aprovechan las células para expresar su fenotipo.

1.4.2 Tratamiento superficial en implantes de Ti

En los primeros tiempos de la osteointegración se utilizaron principalmente implantes de superficie obtenida por maquinado del titanio, sin embargo se observó que en huesos de poca densidad el comportamiento de los mismos no era tan eficiente como en huesos densos. Para modificar esto se comenzó a investigar la influencia de la microtopografía en relación al proceso de cicatrización, advirtiéndose que la textura superficial podía ser tan importante como el enlace químico del titanio [25, 26, 27, 28].

En la actualidad existen diferentes formas de preparar la superficie de los implantes osteointegrados de titanio. Estas son:

- Superficie pulida sin tratamiento [29]
- Con recubrimientos:
 - HA hidroxiapatita [17, 30, 31, 32, 33, 34]
 - TPS plasma de titanio
 - SLA grabado con arenado y ácido
 - Grabado ácido simple y doble
 - Óxido de titanio poroso [35, 36, 37, 38, 39].

Numerosos estudios [40, 41, 42] han demostrado que la aposición de hueso se produce en un mayor porcentaje en implantes que tienen una superficie rugosa, en comparación con los mecanizados de superficie lisa, ya que estos últimos tienen menor capacidad de retener el nuevo osteoide en comparación con los implantes con tratamientos superficiales, con lo cual, la línea de cementación se convierte en la frontera que asegura la osteointegración entre el biomaterial y el tejido vivo.

Por otra parte, son ideales tanto la rugosidad como la superficie desarrollada, de forma tal que aseguran muy buena aposición del tejido óseo de acuerdo con su topografía micromorfológica.

Finalmente, se han creado en la superficie poros en forma de cráteres que favorecen el asentamiento y fijación de las células de osteoblastos, desencadenando la síntesis en la formación del tejido óseo. XUE W. [43] mostró que los efectos como el aumento de la unión celular, la diferenciación celular y la expresión de la fosfatasa se producen cuando se utilizan muestras porosas de Ti con poros más grandes que $200\mu\text{m}$. KARAGEORGIU y KAPLAN [44] consideraron que el tamaño mínimo de los poros debía ser $100\mu\text{m}$ debido al tamaño celular y las características de la migración celular y el transporte. Sin embargo, los poros de $300\mu\text{m}$ se consideran ideales, ya que facilitan la formación de capilares. También es posible correlacionar estos datos con el tamaño de los canales de Havers de aproximadamente $100\text{-}200\mu\text{m}$ de diámetro. Los poros pequeños podrían favorecer la hipoxia, que puede resultar en la formación de tejido osteocartilaginosa, mientras que los poros grandes ricamente vascularizados permiten osteogénesis directa.

Estas superficies producen efectos diferentes a nivel de la oseointegración, especialmente en lo que se refiere al porcentaje de contacto entre hueso e implante (BIC). Estudios que evaluaron el porcentaje de la BIC después de la osteointegración del implante, reportaron una correlación positiva entre topografías específicas de superficies de implantes y cantidad de hueso que contacta con las mismas. Un aumento en la BIC favorece el entrelazado mecánico entre la superficie del implante y el hueso circundante, dando mayor resistencia a la carga durante la función del mismo. En este aspecto, la superficie hueso-Ti ha demostrado ser muy eficaz, tanto clínica como histológicamente.

1.4.3 Titanio e Hidroxiapatita

Para que un material sea bioactivo en el tejido óseo, es condición indispensable que se forme in vivo una capa de hidroxiapatita (HA) sobre su superficie, la cual en última instancia se enlaza con el hueso.

La hidroxiapatita es un material bioactivo para el tejido óseo debido a que es la fase mineral del hueso. Este hecho hace que las células la reconozcan como un material biológicamente no ajeno y esto lleva a la unión química entre ella y el tejido, es decir, se produce biointegración.

Su principal inconveniente son sus propiedades mecánicas, ya que es un material excesivamente frágil. Por esta razón, luego de muchas investigaciones, en el desarrollo de implantes se emplea en conjunto con un metal [17, 30, 31, 32, 45, 46, 47]. Actualmente las tendencias más importantes son implantes de Titanio (bioinerte, con propiedades de osteointegración) recubierto con una capa de hidroxiapatita (bioactivo con biointegración).

Generalmente se acepta que la pureza de la HA debería ser lo más alta posible (superior al 90%), con una relación de peso atómico calcio/fósforo de 1,67. Pero no existe consenso respecto a su grado de cristalinidad, que varía del 50 al 90% en los diferentes tipos de implantes disponibles en el mercado.

1.5 Pulvimetalurgia aplicada al desarrollo de Implantes quirúrgicos

La pulvimetalurgia o metalurgia de polvos es un proceso de fabricación que, partiendo de polvos finos y tras su compactación para darles una forma determinado compactado, se calientan en atmósfera controlada para la obtención de la pieza [48, 49, 50]. Este proceso es adecuado para la fabricación de grandes series de piezas pequeñas de gran precisión, para materiales o mezclas poco comunes y para controlar el grado de porosidad o permeabilidad.

En el presente trabajo se utiliza una variante de este proceso desarrollado en el Laboratorio de Materiales de la FCEFyN. La técnica comienza cuando polvo suelto se mezcla y posteriormente se comprime mediante prensas mecánicas o hidráulicas en una matriz, resultando una forma que se conoce como “pieza en verde” o compactado crudo. Las prensas más utilizadas son uniaxiales, en la que la presión se aplica al polvo en una sola dirección.

El último paso es el sinterizado, que consiste en el calentamiento en horno con atmósfera controlada a una temperatura en torno al 75% de la de fusión. Si el sinterizado se efectúa durante un tiempo prolongado puede eliminarse los poros naturales que quedan del polvo y el material se hace más denso. La velocidad de sinterizado depende de la Temperatura, energía de activación, coeficiente de difusión, tamaño de las partículas originales.

Esta técnica posee muchas ventajas al ser utilizada para la creación de prótesis, como el tiempo corto de fabricación y los costos reducidos en materiales, además de posibilidad de realizar combinaciones de distintos materiales y

mantener control sobre su conformación y porosidad. En cuanto a las desventajas, se encuentra como principal la limitación en el diseño del implante debido al alto costo de las matrices (vea Ilustración 6).

Ventajas	Desventajas
No se desperdicia material. Precisión dimensional y buen acabado. Tiempo de fabricación corto y costos reducidos. Piezas imposibles por otros medios: porosidad controlada, mezcla de metales y no metales (cerámicos).	Elevado costo de las matrices de compactado. Características mecánicas inferiores debido a la porosidad del material. Limitaciones de diseño: sección uniforme en la dirección de compactado, esbeltez limitada, etc.

Ilustración 6: Ventajas y Desventajas de la Pulvimetalurgia⁷

1.6 Estudios del desempeño de biomateriales realizado en animales.

Antiguamente los nuevos descubrimientos eran simplemente evaluados en humanos para observar si eran biocompatibles, pero desde hace algún tiempo, los materiales deben ser sometidos a una serie de pruebas antes de que puedan justificar su empleo inocuo en los seres humanos, estas pruebas están especificadas por la norma ISO 10993 [6], pero solo dos de ellas se realizan en animales, las pruebas de irritación y de implantación (ver tabla nº 9, Anexo N° 1).

Históricamente, el avance técnico y científico en el área de Biomateriales provoca que nuevos elementos surjan día a día en concordancia con nuevas técnicas y procedimientos terapéuticos. Los análisis de la reacción de distintos materiales conllevan diferentes estudios que se realizan de dos maneras distintas: *in vitro* e *in vivo*.

Las pruebas de biocompatibilidad son las pruebas iniciales o primarias las cuales incluyen las pruebas de citotoxicidad (evaluación del efecto de los materiales sobre poblaciones celulares para evaluar la respuesta inflamatoria o inmunológica) y las de mutagenicidad o carcinogénesis (valoran los efectos de los materiales sobre el material genético celular) [5].

Las pruebas intermedias o secundarias son aquellas que permiten medir los niveles de reacciones inflamatorias o de respuestas inmunitarias frente a un material (pruebas de irritación de mucosas, sensibilidad cutánea e implanta-

⁷ Imagen extraída de Wikipedia. Pulvimetalurgia. [En línea] 2007 [Fecha de acceso 12 de mayo de 2016]. URL disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Pulvimetalurgia>.

ción); las pruebas de uso o terciarias se realizan en animales y humanos una vez se hayan realizado las pruebas primarias, las pruebas secundarias y la aprobación de un comité de ética certificado.

<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Pruebas de uso
1. Citotoxicidad: - Crecimiento celular - Permeabilidad de la membrana celular - Biosíntesis enzimática - Pruebas indirectas (barreras) - Pruebas de barrera dentinal	1. Irritación de mucosas	1. En animales
2. Carcinogénesis	2. Sensibilidad cutánea	2. En humanos
3. Mutagénesis	3. Implantación	

Ilustración 7: Pruebas de compatibilidad biológica⁸

Según Norma ISO 10993-2 [51], para pruebas *in vivo* puede utilizarse cualquier vertebrado vivo no humano, con exclusión de las formas fetales o embrionarias y sólo se justifica su uso cuando:

- Han demostrado ser relevantes y fiables para los fines para los que se llevan a cabo,
- Cuando los datos resultantes son esenciales para caracterizar y evaluar el material de ensayo que va a ser utilizado en dispositivos médicos,
- Cuando ningún método de prueba científicamente válido, que no requiere el uso de animales vivos, es razonable y factible,
- En el caso en que todas las otras estrategias pertinentes para reducir al mínimo el dolor, sufrimiento, angustia y daño duradero causado a los animales que se utilizan, se han identificado y puesto en práctica.

Los animales de mayor uso para test *in vivo* por su similitud con el organismo humano en cuanto a respuesta de tejidos son los ratones, las ratas, los hámsteres, los hurones y los conejos [24, 52, 53]. También se han utilizado ovejas, monos [23], bovinos, cerdos [21], perros [46, 54] y gatos.

En la FCEFYN el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) es quien tiene la tarea de revisar, aprobar y supervisar todos los protocolos de investigación que incluyen animales de laboratorio [55].

⁸ Ilustración extraída de Villegas A, Naranjo E, Gómez D, Pruebas de biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico: Revisión de la literatura. Revista Estomatología 2008; 16 (2): 38-44.

1.7 Interfase Hueso-Implante

La osteointegración es la conexión estructural y funcional entre el hueso y un implante (Vea Ilustración 8). Cuando un implante se inserta en el hueso, se crea la denominada interfase hueso-implante, una zona de unión entre la superficie del biomaterial del implante y el hueso circundante. Está indicando una aposición ósea directa sobre la superficie del implante, sin que exista interposición de tejido blando [56, 57, 58, 59]. Sin embargo nunca existe un 100% de contacto entre ambas superficies. La cicatrización de esta interfase depende de las condiciones biológicas del hueso, las características de diseño del implante y la distribución de cargas entre hueso e implante.

Tras una lesión, como la producida por el procedimiento de inserción de un implante, la matriz ósea mineralizada se recupera siguiendo cuatro etapas, 1. Formación del hematoma (sangrado y coagulación); 2. Degradación del coágulo y limpieza de la herida (fibrinólisis); 3. Formación de tejido granular (angiogénesis) y 4. Formación de nueva matriz ósea (modelado óseo).

En el caso de los implantes, tanto la síntesis de nuevo osteoide como su mineralización están relacionadas con la topografía superficial de la pieza implantada. Los implantes en su superficie deben tener la habilidad de soportar las tensiones ejercidas por las células que migran sobre la red de fibrina y colágeno y que restauran los tejidos lesionados.

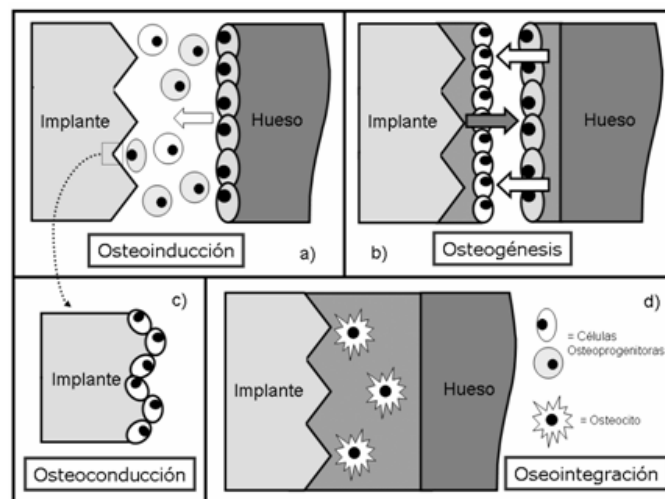


Ilustración 8: Interfase hueso-implante⁹

El motivo de fracaso de la mayoría de los sistemas de implantes es que éstos se encapsulan en un tejido de cicatrización fibroso (fibrointegración) mal diferenciado lo que crea movilidad, que lleva a reacciones desfavorables y finalmente a la pérdida [56].

⁹ Ilustración extraída de Vanegas C, Landínez NS, Garzón-Alvarado DA, Generalidades de la interfase hueso-implante dental. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas 2009; 28(3): 130-146.

La fibrointegración puede estar causada por muchos factores dado que dicho implante reacciona por un proceso de óxido-reducción y este proceso depende de la solubilidad de la superficie, la superficie del implante altamente reactiva, las bacterias, el pH, fluido intercelular y factores biomecánicos.

1.7.1 Calidad de la interfase Hueso-Implante

A pesar que la osteogénesis de contacto forma tejido óseo a una velocidad 30% mayor que la osteogénesis a distancia, la formación desde la superficie del implante implica que dicha superficie permita su colonización por parte de células de origen mesenquimal. Esta colonización (osteoconducción), corresponde a la formación de hueso sobre una superficie de material bioactivo.

Para evaluar la calidad se deben analizar varios factores que contribuyen a la osteointegración, ellos son:

-Carga por fuerzas externas: tanto hueso como implante, deben estar sometidos a cierta cantidad de esfuerzo dentro de un rango de equilibrio. En el caso del implante, los esfuerzos deben ser tales que se evite la fatiga del material y su posible fractura. Por su parte, en el hueso es sabido que el sobre-esfuerzo puede causar resorción, mientras que un esfuerzo muy bajo puede dar lugar a atrofia por desuso y la consecuente pérdida del hueso.

-Acción fisiológica: existe un contacto adicional creado por la presencia de fluidos fisiológicos durante las etapas tempranas de la cicatrización. Estos fluidos crean una capa aislante entre el implante y el medio circundante que depende de las características del implante, en especial, la tensión interfásial, el potencial zeta y la hidrofobicidad. La tensión interfásial relaciona las fuerzas de adhesión de las células y las fuerzas de cohesión de los átomos al interior del material, de manera que si las fuerzas de cohesión son mayores que las fuerzas de adhesión habrá muy poca o nula interacción física entre el material y su medio. El potencial zeta es la diferencia de potencial en la superficie de contacto entre un material y su medio externo. Bajos potenciales zeta estimulan la diferenciación de células osteogénicas en la superficie del material y las superficies cargadas negativamente poseen una excelente biocompatibilidad. Por último, la hidrofobicidad es la neutralidad de carga en la superficie del implante que impide su interacción con las moléculas de agua. Si el material con el que se fabrica un implante tiene una carga superficial tal que exista una polaridad superficial, entonces dicho material se denomina hidrofílico, mientras que si el material posee poca o ninguna polaridad superficial se denomina hidrofóbico. Se prefieren los materiales hidrofílicos porque reaccionan más rápidamente a

las proteínas presentes en el plasma sanguíneo y porque aumentan la respuesta de las células osteoprogenitoras en la superficie del material.

-Recubrimientos superficiales: La tensión interfásial toma mayor importancia cuando se tiene el caso de implantes con recubrimientos superficiales. La idea detrás de esta estrategia es hacer la superficie metálica, comúnmente de titanio, más favorable para las células óseas, lo que permite una mejor cicatrización en reemplazo del encapsulamiento fibroso. Sin embargo, el uso de recubrimientos superficiales es exitoso si los materiales utilizados permiten la osteoconducción y soportan las tensiones interfásiales producidas durante la carga del implante.

1.8 Métodos evaluativos de la osteointegración

Las técnicas aplicadas en la actualidad para evaluar biocompatibilidad y oseointegración, pasado un período considerable luego de la implantación, son variadas. La Norma ISO 10993-6 [7] plantea propuestas a seguir, sin embargo existen otras que si bien no son nombradas allí, fueron llevadas a cabo en distintas investigaciones que trataron la actuación de ciertos implantes [59, 60, 61, 62, 63, 64]. Se clasifican en invasivas y no invasivas, *in vivo* o *ex vivo*.

Los estudios *in vivo* son principalmente placas radiográficas y estudios tomográficos con reconstrucción 3D. En cuanto a los análisis *ex vivo* se utilizan microscopía óptica, microscopía confocal, microscopía electrónica y estudios histológicos bajo tinción, de los cuales la Norma ISO 10993-6 solo recomienda un estudio macroscópico para estudiar las zonas de contacto implante-tejido y uno histológico para analizar la presencia de ciertas células.

La evaluación *ex vivo* ofrece mayores posibilidades de interpretación de la oseointegración que los realizados *in vivo*.

1.8.1 Radiografías

Una forma de analizar el grado de oseointegración de un implante, que puede ser hecho *in vivo* o *in vitro*, es mediante la realización de una placa radiográfica donde se puede evaluar el hueso de manera cualitativa y cuantitativa.

El “**análisis cualitativo**” se realiza evaluando la escala de graduación de imágenes radiográficas [65]. La presencia de una imagen radiolúcida periimplantaria indica la existencia de tejido blando circundante y esto constituye

un signo de fracaso del implante. En la mayoría de los casos cuando se observa una imagen radiolúcida apical el implante presentará movilidad.

Además con las placas radiográficas se puede distinguir el tipo de reparación que se está llevando a cabo en el hueso, ya sea 1º o 2º según haya formación o no de callo.

El “**análisis cuantitativo**” se hace con densitometría ósea [66], que es una prueba para determinar la densidad mineral ósea. Se puede realizar con rayos x, ultrasonidos o isótopos radiactivos. El test se realiza con el aparato que mide las imágenes y da una cifra de la cantidad mineral ósea por superficie (Vea ecuación 1). Trabaja midiendo un hueso específico, o más, usualmente de la columna vertebral, cadera, antebrazo. La densidad de esos huesos es comparada con un valor promedio basado en edad, sexo, tamaño ya determinado (vea Ilustración nº 9).

Bone Sites	Mean Diameter Values and Standard Deviation (nm)	
	Female	Male[13]
Front tibia	34.5 ± 7.1	47.1 ± 10.4
Rear tibia	38.1 ± 6.5	48.8 ± 12.2
Femoral	39.5 ± 6.5	50.4 ± 11.8

Ilustración 9: Media de valores de diámetro de fibrillas de colágeno en ratas¹⁰

La comparación de resultados se usa para determinar el riesgo de fracturas y el estado de osteoporosis en un individuo.

$$DPH = \frac{CMH}{A} [g/cm^2]$$

Ecuación 1: Densidad Promedio del Hueso

Siendo: CMH = contenido mineral del hueso (g/cm) y A = ancho de la línea escaneada.

Otro método de análisis, poco utilizado, donde se utilizan dos energías de rayos X es para la determinación *in vivo* de la relación de Hyp/Col. El método supone que el hueso es un componente de tres sistema: hidroxapatita, colágeno, y agua, y que la composición de la hidroxapatita es constante. En-

¹⁰ Imagen extraída de Berillis P, Emfietzoglou D, Tzaphlidou M. Collagen Fibril Diameter in Relation to Bone Site and to Calcium/Phosphorus Ratio. Scientific World Journal 2006; 6:1109–1113.

tonces, como el hueso es una forma especializada de tejido conectivo formado por cristales de hidroxiapatita dentro de una matriz de colágeno, el cociente hidroxiapatita/colágeno podría ser utilizado como un índice de calidad de los huesos.

1.8.2 Análisis Histológico

La norma ISO 10993-6 [7] recomienda evaluar mediante técnica histológica la extensión de la fibrosis y la inflamación, la degeneración por cambios en la morfología de los tejidos, los tipos de células inflamatorias (polimorfonucleares, leucocitos, linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos, macrófagos y células multinucleadas. También se debe evidenciar la presencia de necrosis (determinada por los desechos nucleares y/o avería de la pared capilar) y otros parámetros tales como restos de material, infiltración grasa, granuloma.

En la tabla nº 8 del Anexo N° 1, se muestra un modelo de evaluación histológica siguiendo las recomendaciones de la ISO 10993-6.

1.8.3 Evaluaciones mediante Microscopía Electrónica de barrido (SEM)

Los distintos trabajos realizados actualmente sobre implantes óseos plantean su análisis en base a estudios microscópicos del tipo confocal y electrónico [22, 40, 68, 69].

Entre las aplicaciones en oseointegración que se pueden obtener a través del microscopio confocal se destacan la posibilidad de detección de osteoblastos sembrados en el metal, análisis fisiológico de respuesta de Ca^{2+} , estudio de interacciones entre proteínas, entre otras.

El microscopio electrónico de barrido (SEM) se utiliza para obtener imágenes de gran resolución de los rasgos topográficos superficiales. Su fundamento consiste en hacer interaccionar un haz primario de electrones sobre un área del objeto que se pretende estudiar, por lo cual la muestra, si no es conductora, debe estar recubierta de un material conductor como el oro o el carbono).

En la valoración de osteointegración mediante imágenes SEM y EDS se aplican generalmente dos métodos:

- **BIC (Bonet to Implant Contact):** Es el porcentaje de la longitud del implante en el que hay contacto con el hueso directamente, sin intervención del tejido fibroso. Que exista BIC sugiere que hay oseointegración [70, 71]. Para su cálculo se mide la longitud total del implante (biomaterial a estudiar) y la longitud que se encuentra en contacto con el hueso.
Este tipo de prueba se realiza sobre las imágenes microscópicas de la región a 40X de aumento y con ayuda de un procesador de imágenes adecuado para el tamaño de dicha imagen.
- **Análisis de presencia de minerales a través de EDS-SEM:** Se trata de la determinación de la composición química del área de contacto entre el tejido y el biomaterial en cuestión realizada con la técnica EDS del microscopio electrónico de barrido.
En cuanto al contenido mineral óseo, en general se acepta que su medición es una apropiada estimación de la resistencia ósea (dependiente de la masa y geometría del hueso).
Además según diversas investigaciones, la determinación de la relación Ca/P puede proporcionar una medida sensible para determinar la “calidad del hueso” tomando como referencia que la relación Ca/P para la HA (componente fundamental) es de 1,67 [72, 73, 74].

1.9 Estudios estadísticos

Los resultados de las investigaciones experimentales necesitan de la estadística como herramienta para lograr una buena interpretación.

Una afirmación empírica es posiblemente verdadera y posiblemente falsa. Para poder establecer su veracidad se procede a la recolección de datos en una muestra de participantes o unidades experimentales para establecer conclusiones sobre una población. Se trata de un proceso de inferencia estadística desde la muestra a la población.

Cuando se quiere evaluar el grado de asociación o independencia entre una variable cuantitativa y una variable categórica (que clasifica o diferencia a los individuos en grupos, tantos como categorías tiene dicha variable), el procedimiento estadístico inferencial recurre a comparar las medias de las distribuciones de la variable cuantitativa en los diferentes grupos establecidos por la variable categórica. Si ésta tiene solo dos categorías (es dicotómica), la comparación de medias entre dos grupos independientes se lleva a cabo por el test t de Student; si tiene tres o más categorías, la comparación de medias entre tres o más grupos independientes se realiza a través de un modelo matemático

más general, el Análisis de la Varianza (ANOVA) o test de muestras apareadas cuando el control y el problema se encuentran en el mismo animal. En todos los casos, las pruebas estadísticas son exigentes con ciertos requisitos previos:

- Distribución normal de la variable cuantitativa en los grupos que se comparan.
- Homogeneidad de varianzas en las poblaciones de las que proceden los grupos;

El no cumplimiento de las condiciones nombradas conlleva la necesidad de recurrir a pruebas estadísticas “no paramétricas”.

Además se consiguen evidenciar los datos relacionados a cada tipo de implante de manera general mediante estadísticos descriptivos como la media, mediana, varianza y desviación estándar, que sirven de ayuda para luego realizar un análisis más profundo.

Objetivos

Objetivos Generales

- Sistematizar el modelo experimental in vivo para evaluar biomateriales como reemplazo óseo diseñado en Proyecto Integrador de FCEFyN en el año 2015 [1]. Para ello encuadrar el procedimiento experimental en el marco de regulación para productos médicos nacionales y realizar los cambios pertinentes para su adaptación a las normas vigentes. Luego, ejecutar la implantación, evaluar y comparar desempeño y resultados de osteointegración en dos tipos de muestras: Titanio poroso y Titanio-Hidroxiapatita, comparándolos con Titanio Denso.

Objetivos Específicos

- Estudiar la implementación del modelo experimental para evaluar biomateriales in vivo, desarrollado en el año 2015, y proponer mejoras en técnicas e instrumentación utilizadas en cada etapa.
- Diseñar y fabricar nueva matriz para la producción de implantes adaptados a las nuevas necesidades.
- Evaluar calidad de interfase hueso-implante para cada tipo de material constituyente mediante distintos métodos micro y macroscópicos.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

En el presente Proyecto Integrador se desarrollaron todos los pasos necesarios para lograr una sistematización del modelo experimental que fue elaborado en el año 2015 para evaluar titanio como reemplazo óseo [1].

Para lograr dicha sistematización se tomó al modelo experimental como parte de uno de los requisitos de la norma ISO 10993-1 [6] para comprobar la biocompatibilidad de un producto médico implantable.

Los ensayos requeridos por dicha norma, en su primera parte [6], para dispositivos de reemplazo óseo con un contacto de más de 30 días son: Este trabajo corresponde a una de las pocas que se desarrollan *in vivo*, la “Implantación”. De este modo, en cada paso de este trabajo, se realizó una comparación del modelo experimental in vivo elaborado en la FCEFyN con el propuesto por la norma en su parte 6: “Biological evaluation of medical devices - Tests for local effects after implantation” [7].

En este capítulo se detallarán e identificarán los materiales, equipos, software y espacios utilizados durante los pasos seguidos a lo largo de todo el proyecto integrador.

2.1 Elección del modelo animal

La sexta parte de la Norma ISO 10993 [7] expresa que para la implantación se debe seleccionar una especie animal con la debida consideración del tamaño de las muestras de ensayo, la duración prevista de la prueba en relación con la vida útil esperada de los animales, así como las diferencias de las especies en la respuesta biológica de los tejidos. Además, para las pruebas de largo plazo en el tejido subcutáneo, músculo y hueso, se recomiendan animales tales como ratas, cobayas, conejos, perros, ovejas, cabras y cerdos.

Debido a la disponibilidad de la Cátedra de Fisiología Animal perteneciente a FCEFyN y continuando con el modelo experimental diseñado en Proyecto Integrador en colaboración de la cátedra mencionada anteriormente y el Laboratorio de Materiales de la FCEFyN [1], se utilizaron para el procedimiento experimental doce ratas macho de la cepa Wistar nacidas en los días 11 y 12 del mes de marzo de 2016, las cuales fueron sometidas a cuidado extremo pre y post-quirúrgico.

El lugar de implantación elegido, al igual que el trabajo anterior [1], fue el fémur, debido a que generalmente cuando se trabaja con animales pequeños, los huesos largos son apropiados para estudiar la reparación del tejido óseo y

dentro de dicho tipo, el fémur es el hueso tubular que posee mayor diámetro. Su ventaja radica en la aplicación de implantes de mayores dimensiones. Además el paquete muscular que lo rodea le aporta la contención necesaria para mantener la pieza en su sitio luego de la implantación.

La fecha de las cirugías fueron programadas desde el día de nacimiento de los animales para que coincidieran con las once semanas de vida, dado que según investigación [66, 75], las ratas macho presentan un último incremento dimensional de fémur en el período de juventud-adulthood (entre las semanas 11 y 14 de vida), a partir de la cual comienza a disminuir la talla.

2.1.1 Usos y cuidados

Las doce ratas se mantuvieron en el Bioterio perteneciente a la Cátedra de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, sede centro. Fueron sometidas a ciclos de luz y oscuridad de 12 hs. y temperatura de 22 °C con agua y comida ad libitum.

Se programó una limpieza cada 48 hs donde se realizó el recambio de viruta y la manipulación manual de los animales ya que, según investigación [76], éstos deben ser manipulados diariamente con el fin de disminuir el estrés en el momento de ser utilizados para los experimentos o sacrificio.

2.2 Diseño y fabricación de la matriz

En las conclusiones del proyecto realizado en el año 2015 [1], se propuso disminuir el tamaño de los implantes a 1,8 mm de diámetro (20% menor al usado anteriormente) con el objetivo de que la trepanación del fémur sea menos traumática y así evitar fracturas. Además se planteó eliminar el paso de terminación manual de la pieza para conservar la superficie del sinterizado y reemplazar el material constitutivo de la matriz (cerámica) por otro que permitiera la compactación de las piezas a presiones mayores.

En consideración a dichas propuestas se comenzó el proyecto con el diseño de una nueva matriz que pudiese reunir todas las características. Se confeccionó un listado de requerimientos en base a lo que se necesitaba cambiar de la elaboración anterior y se apuntó a una herramienta que permitiera lograr la pieza en verde lista para el sinterizado mediante el llenado con polvo y la compactación:

- Cilindro para pieza de 1,8 mm o menos,
- Material resistente a compresión
- Diseño que permita la realización de una pieza por vez y en menor tiempo.
- Desmolde de la pieza sin utilizar elemento adicional luego de someterse a alta presión de compactación. .

El software utilizado para el diseño fue “PRO ENGINEER” (vea Ilustración 10). Mediante su uso fue posible elegir el material, trazar la geometría y visualizar los cortes determinando ángulos necesarios para un desmolde fácil de la pieza y dimensiones que permitieran lograr una probeta objetivo de 1,7 mm de diámetro y 1,5 mm de alto.

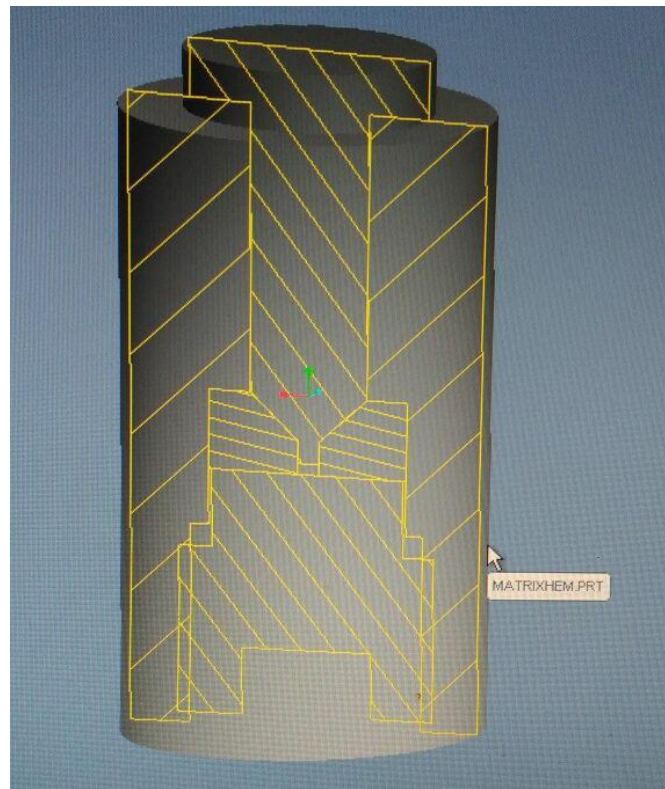


Ilustración 10: Diseño de matriz en software.

Una vez que se concluyó con el diseño de la matriz, la fabricación de la misma fue derivada a la empresa de José M. Alladio e Hijos S.A., líder en Argentina en la fabricación de lavarropas automáticos, semiautomáticos, componentes y secarropas y que se ofreció a colaborar poniendo a disposición una máquina que trabaja por el método de electroerosión.

En la empresa se realizaron los planos de cada componente de la matriz con las medidas exactas y necesarias para ser introducidos en el software de

control numérico de la máquina realizadora. Los planos están disponibles en el Anexo N° 2.

La matriz fue lograda en Acero n° 4140 resistente a la alta compresión. Consta de cinco partes (vea ilustración 11):

- Porta Matriz, cuyas medidas son: cilindro exterior de 30 mm de diámetro y 50 mm de alto, cilindro interno para alojamiento del vástago de 10 mm de diámetro y 25 mm de alto, cilindro interno para hembra y disco de apoyo de 17 mm de diámetro y 12,1 mm de alto y cilindro para rosca de 30 mm de diámetro y 12,9 mm de alto.
- Vástago: cilindro de 9,95 mm de diámetro y 27 mm de alto, punzón de 1,75 mm de diámetro y 2 mm de alto, vertiente de 4,1 mm entre cilindro y punzón.
- Hembra (base de apoyo para vástago y punzón): Cilindro de 16,95 mm de diámetro externo y 7,1 mm de altura, orificio interno de 1,8 mm y 3,05 mm de alto para depósito de punzón.
- Disco de soporte para la hembra: 16,9 mm de diámetro por 7 mm de alto.
- Tapa de cierre a rosca.



Ilustración 11: Matriz con sus cuatro partes.

2.3 Fabricación de “Implantes en verde”

La técnica de fabricación de piezas bioimplantables utilizada en este proyecto, llamada Pulvimetalurgia, comienza con la mezcla de los polvos de materiales constituyentes y se prosigue con su compactación en frío en matriz para formar la llamada “pieza en verde” (vea Anexo N° 3).

2.3.1 Mezcla de polvos- Primeras pruebas

Aplicando la técnica de pulvimetalurgia desarrollada en el Departamento de Materiales de la FCEFyN para la obtención de las piezas, se elaboraron las primeras pruebas a fin de poder medirlas y determinar la cantidad de polvo a utilizar para lograr dicho tamaño en las siguientes.

Se comenzó determinando los parámetros de elaboración. Según otras experiencias realizadas [49], se definió una presión de compactación para la pieza en verde de 390 MPA.

Posteriormente, con el dato de la presión se calculó que la fuerza de compactación a utilizar sería de 101,1 kgf (vea ecuación 2) y por último que la masa de Hidruro de Titanio debía ser de 20 mg, siendo la densidad del hidruro de titanio utilizado de 3,91 g/ml (vea ecuación 5).

$$A = \pi r^2 = \pi(0,9\text{mm})^2 = 2,54 \text{ mm}^2$$

Ecuación 2: Área de la pieza

$$Fuerza = P * A = 390,10^6 \frac{N}{m^2} * 2,54 * 10^{-6} m^2 = 992,43 N = 101,1 Kgf$$

Ecuación 3: Cálculo de Kgf para la compactación

$$v = \pi * r^2 * h = \pi * (0,9\text{mm})^2 * 2\text{mm} = 5,89\text{mm}^2 = 5,89 * 10^{-3} \text{ml}$$

Ecuación 4: Volumen de la pieza

$$m = 3,91 \frac{g}{ml} * 5,89 * 10^{-3} \text{ml} = 20 \text{ mg}$$

Ecuación 5: Masa del implante

Luego de conocer los valores expuestos anteriormente, se elaboraron los implantes haciendo uso de matriz y máquina de compresión (*Tensile Testing Machine, B1/E Type, Cometech*).

Las proporciones y materiales usados para la fabricación de las pastillas fueron:

- Para piezas de titanio denso (Ti): polvo de Hidruro de Titanio (TiH₂), Sigma-Aldrich, 3,91 g/mL a 25°C
- Para piezas de titanio poroso (Ti-P): 40% de Bicarbonato de Amonio (NH₄HCO₃)- 60% de Hidruro de Titanio (TiH₂)
- Para piezas de Titanio con Hidroxiapatita (Ti-HA): 20% HA previamente tamizada- 80% de Hidruro de Titanio (TiH₂).

2.3.2 Determinación de dimensiones y pesos de las piezas

Una vez fabricadas las pruebas piloto, se procedió a tomar las medidas de cada una mediante lupa (x20, x40), cámara para conexión a pc y software (*Motic Image Plus 2.0*) (vea Anexo N° 4).

Según medidas del fémur del modelo animal en la semana 11 de vida, definimos, luego de varias pruebas, que las dimensiones óptimas del implante serían 1,6 mm de diámetro y 1,5 mm de alto/espesor.

Luego de la elección de la pieza cuyas medidas eran adecuadas para el hueso elegido del animal, se determinó que el peso de polvo a utilizar para la fabricación de una unidad sería de 21,4 mg.

Se realizó posteriormente el fraccionamiento necesario para la elaboración de 18 piezas de Titanio denso, 12 piezas de titanio poroso y 12 piezas de TI-HA. Para ello se utilizó una balanza adecuada para pesaje en miligramos perteneciente al departamento de Química Orgánica y Biológica de la FCEFyN.

El fraccionamiento permitió lograr todas las piezas de forma y tamaño homogéneo, que luego del desmolde estuvieron listas para el próximo paso de la línea de producción, eliminando uno de los problemas del proyecto anterior [1] donde se perdían las propiedades superficiales por disminuir manualmente las dimensiones.

2.4 Sinterizado

El último paso en la técnica de pulvimetalurgia es el sinterizado de la pieza, el cual se siguió según investigación realizada en el departamento de Materiales [49].

Este procedimiento se llevó a cabo en un horno de alta resistencia bajo una atmósfera de gas Argón 5.0 de alta pureza. Como cámara de sinterizado se utilizó un tubo de acero inoxidable cerrado, de 50 mm de diámetro y 500 de longitud con una canastilla para soporte de las piezas. Además se incluyó dentro de la cámara una termocupla que nos permitió realizar un seguimiento de los ciclos térmicos establecidos.

Para implantes de titanio denso y de titanio con Hidroxiapatita se aplicó 500 °C durante 30 minutos para deshidrurar y 800 °C durante 45 minutos para sinterizar (vea ilustración 12).

Para piezas de titanio poroso, 200 °C durante 30 minutos para eliminar el Bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3), 500 °C durante 30 minutos para deshidrurar y 800 °C durante 45 minutos para sinterizar (vea ilustración 13).

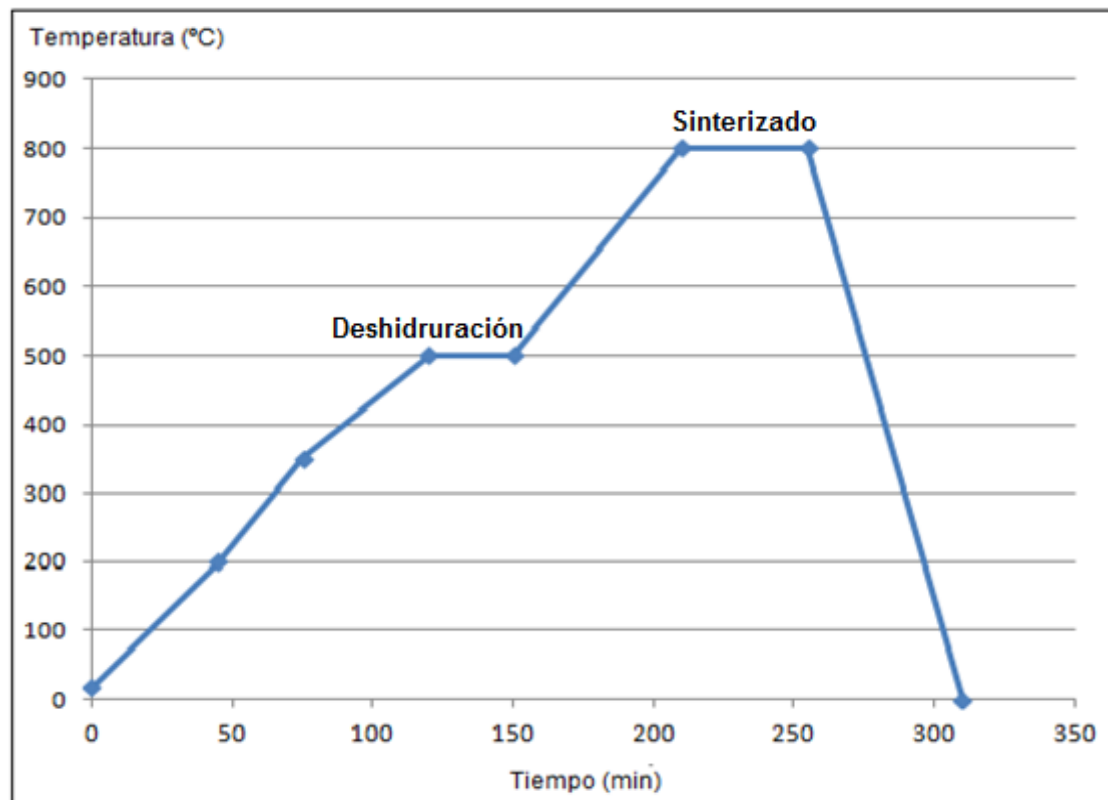


Ilustración 12: Ciclo térmico aplicado a piezas de Ti y de Ti-HA

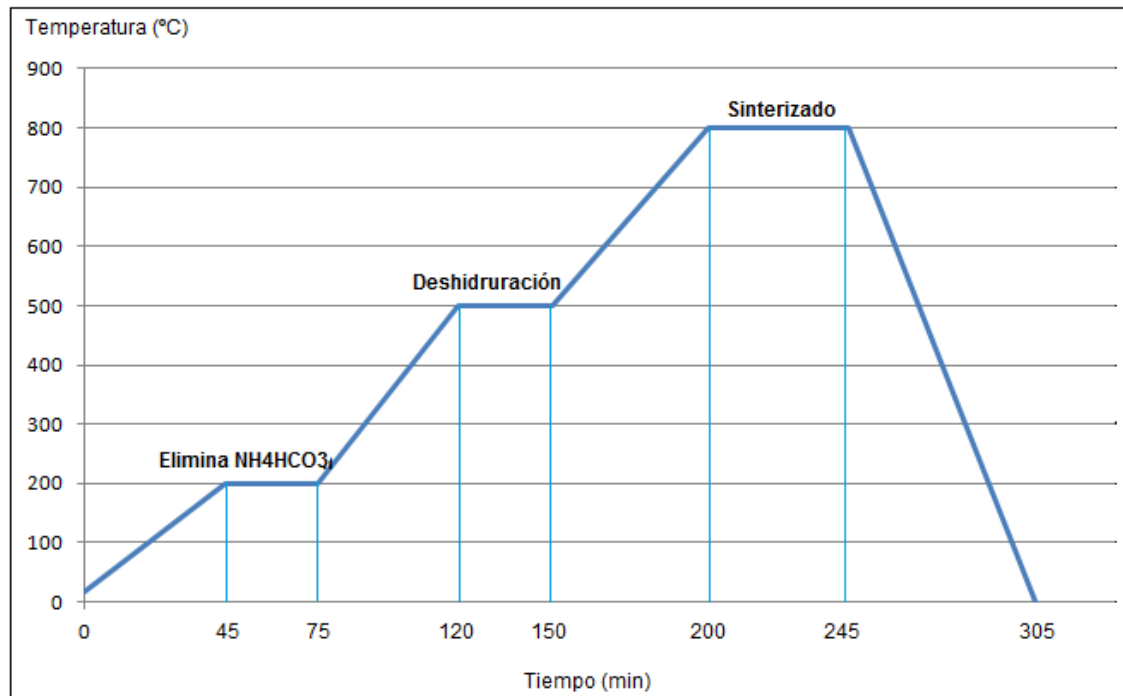


Ilustración 13: Ciclo térmico aplicado a piezas de Ti-P

2.4.1 Prototipos de soportes para sinterizado

La cámara que se decidió utilizar en una primera instancia de sinterizado fue un tubo de acero inoxidable cerrado, de 50 mm de diámetro y 500 de longitud con una canastilla para soporte de las piezas (vea ilustración 14). Pero, el problema radicaba en que la canastilla contenía perforaciones para el paso del gas Argón que eran más grandes que el diámetro de los implantes fabricados.

Se elaboró como primer prototipo un soporte de acero inoxidable con doble perforación de 0,5 mm en la base y 1 mm en la superficie (vea ilustración 15). El objetivo era que el gas ingresara por debajo y por arriba de la pieza logrando una atmósfera que mantuviese las probetas en contacto con el gas durante todo el ciclo térmico.

La experiencia no tuvo un buen resultado ya que al finalizar el ciclo térmico las piezas se encontraban azules por la oxidación y se hacían polvo al aplicarle una pequeña presión manual.

La segunda opción era cambiar de cámara por otra que poseía en su extremo una cajita de acero inoxidable lisa en su superficie. El inconveniente en esta ocasión era que la separación entre el tubo que proveía de Argón y la caja de sustento era mayor que la altura de la pieza, por lo que se diseñaron luego dos prototipos de soportes posibles donde alojar los implantes y donde el gas pudiera crear una atmósfera permanente y no circulante.

Se fabricó primeramente un estuche cilíndrico de acero inoxidable cerrado en uno de sus extremos y dentro de él una cerámica de termocupla con doble orificio donde se introdujeron las piezas en filas (vea Ilustración 16).

Nuevamente el resultado no fue el esperado, en este caso las pastillas fueron sinterizadas correctamente ya que no se desarmaban al ser sometidas a presión pero el grado de oxidación superficial era alto.

El otro prototipo fabricado se hizo en el Laboratorio del Vidrio de FCE-FyN donde se logró moldear un estuche de cuarzo en forma de gota que iría adherido directamente al tubo proveedor del gas (vea Ilustración 17).

El sinterizado en este caso tuvo buen resultado, el material no se descompuso y la superficie no evidenció oxidación en la mayoría de los casos, el resto presentó solo una fina capa que fue eliminada con lija al agua de 1000. Por lo tanto, todas las piezas a implantar fueron sometidas a los distintos ciclos térmicos utilizando este último prototipo.



Ilustración 14: Canastilla de la cámara



Ilustración 15: Soporte de Acero Inoxidable



Ilustración 16: Vaina de cerámica con soporte de Al



Ilustración 17: Estuches de cuarzo

2.5 Análisis metalográfico

Para realizar la técnica metalográfica se eligieron al azar tres piezas de cada tipo de composición (Ti, Ti-P y Ti-HA) las cuales debieron someterse a una preparación previa. En dicha preparación se utilizaron como materiales Resina preacelerada 101510 (*Todo Droga*), Catalizador para resina, soportes metálicos para molde y arcilla para contener la resina líquida donde fue alojada la pieza.

Luego de 24 hs, la resina pasó a su estado sólido y se procedió al pulido de la muestra mediante pulidora metalográfica (vea ilustración 18), lijas al agua de granulidad decreciente (240, 360, 400, 600, 1000, 1200, 1500, 2000), tela libre de polietileno y alúmina tipo CR libre de aglomerados (*calidad Premium, Prazis*).



Ilustración 18: Pulido de muestra para Metalografía

Las muestras listas fueron observadas con Lupa estereoscópica (x20, x40) y luego con Microscopio Leica (x100, x200, x500, x1000). Se analizaron mediante software por medio de cámara para comunicación con pc.

2.6 Limpieza por ultrasonido 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 de 70 °C también de 30 minutos.

Ante la sospecha de que la pieza de Ti-HA no iba a soportar las vibraciones sin desintegrarse liberando las partículas de Hidroxiapatita, se decidió someter solo una al proceso, comprobando finalmente la hipótesis al observar la pieza mediante lupa y ver las grietas y poros resultantes (vea ilustración 19). Por tal motivo, los implantes de Ti-HA solo fueron esterilizados.

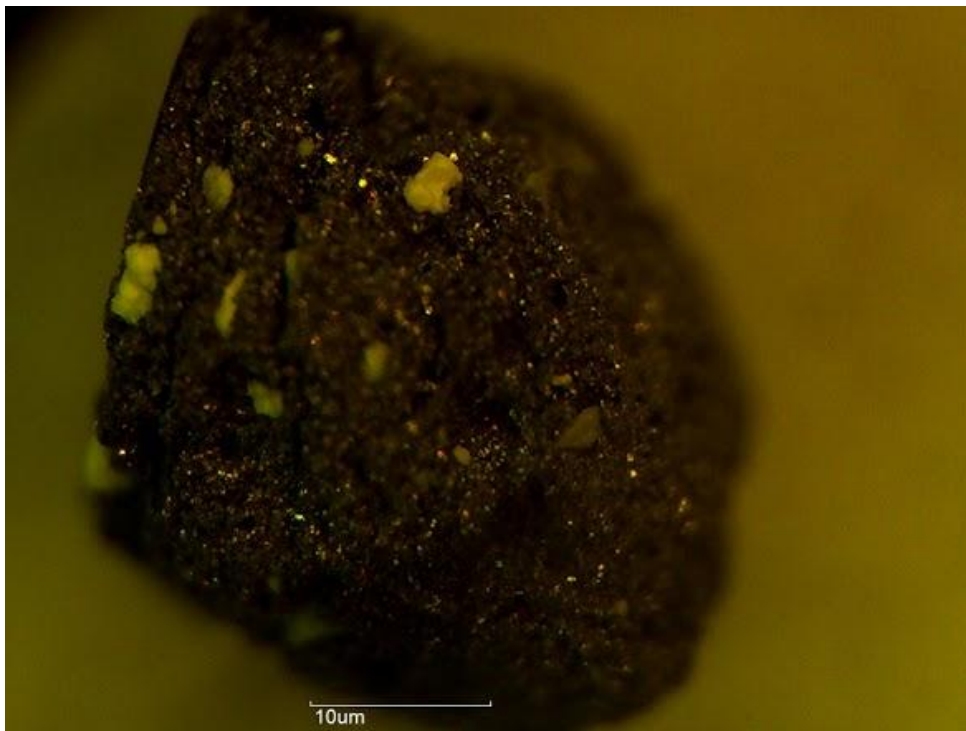


Ilustración 19: Pieza de Ti-HA sometida a lavado ultrasónico

La esterilización se realizó a calor seco, ya que de este modo se produce la destrucción de los microorganismos por oxidación de sus componentes celulares.

El proceso se llevó a cabo en un horno especial que permite la distribución uniforme del calor en su interior. El tiempo de esterilización se debe de-

terminar para cada tipo de material. Según guía del Ministerio de Salud de la Nación [77], la temperatura puede ser de 160 °C por 2 hs, 170 °C por 1 hs o 180°C por 30 minutos. La opción elegida fue la de mayor temperatura por un tiempo más corto (180 °C durante 30 minutos).

Las piezas fueron empaquetadas individualmente en papel aluminio y luego envueltas por tipo de composición en paquetes más grandes.

2.7 Procedimiento quirúrgico

Cumplidas las 11 semanas de vida de las ratas, se procedió a la intervención quirúrgica para realizar los implantes.

El modelo seguido fue el establecido en el año 2015 por el Proyecto Integrador realizado con las cátedras de Materiales y Fisiología Humana de FCEfyN [1] donde se buscó procurar el bienestar animal basándose en los conceptos de 3R y cinco Libertades [78]. El protocolo de implementación fue aprobado por CICUAL, quien comprobó que el proyecto cumple con las normativas dictadas en relación al manejo y tratamiento de animales de laboratorio.

Los pasos aplicados en general fueron los mismos, solo se realizaron pequeñas modificaciones que pueden verse en el Anexo N° 5 en forma detallada acompañados de ilustraciones.

En cuanto a los materiales la única diferencia se encuentra en la fresa utilizada para la trepanación del fémur que debió ser de dimensión inferior (aproximadamente la mitad) de la usada el año anterior por la disminución de la pieza a implantar.

El lugar elegido para las cirugías fue el Laboratorio de la Cátedra de Fisiología Animal de FCEfyN sede centro. El lugar fue calefaccionado previo a las intervenciones ya que generalmente los animales entran en hipotermia luego de someterse al procedimiento quirúrgico. Además fueron trasladados hacia allí 30 minutos antes para lograr adaptación y tranquilidad de los mismos.

2.7.1 Prueba preliminar

Una semana antes de la fecha dispuesta para el comienzo de las cirugías, se realizó una prueba de las partes más importantes del procedimiento quirúrgico sobre una rata muerta en estado de congelación.

El objetivo de esto fue elegir el diámetro necesario de la fresa a utilizar de modo que el implante se pueda introducir sin ejercer presión alguna sobre el hueso.

2.7.2 Sujetos experimentales

Fueron utilizadas 12 ratas de la cepa Wistar nacidas y criadas en el Bioterio de la FCEFyN. El número de animales a intervenir se eligió en base al “n” necesario para establecer una estadística adecuada. Se determinó implantar dos piezas por animal, una en cada pata, de las cuales las 12 izquierdas serían los “controles” de Titanio denso mientras que las 12 patas derechas alojarían a los “problemas”, 6 de Titanio poroso y 6 de Titanio e Hidroxiapatita.

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

Las cirugías fueron programadas para ser completadas en una semana, de lunes a viernes, donde dos días se operaron 3 animales en cada uno y el resto 2 ratas por día.

2.7.3 Materiales usados en la cirugía

Los animales fueron anestesiados con Hidrato de Cloral al 6%, el cual debió ser calculado para cada rata según el peso (470mg/kg). 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 utilizó alcohol para la desinfección y luego se rasuró. Para el corte, incisión y separación de los músculos Bíceps femoral y Glúteo mayor se usaron Pinzas de campo, bisturíes y tijeras de disección.

La trepanación del hueso fue realizada con un torno odontológico eléctrico adosado a una fresa esférica de 1,5 mm de diámetro.

Para finalizar, fueron empleadas Agujas y Nylon para la sutura y también Ibuprofeno inyectable como analgésico para la recuperación.

Estando aún bajo efecto de la anestesia y luego de realizados los implantes en ambas patas, se procedió a la realización de cortes de forma triangular en las orejas de los animales con el fin de identificación, según método utilizado por la cátedra de Fisiología Animal [79] (vea Ilustración N° 20).

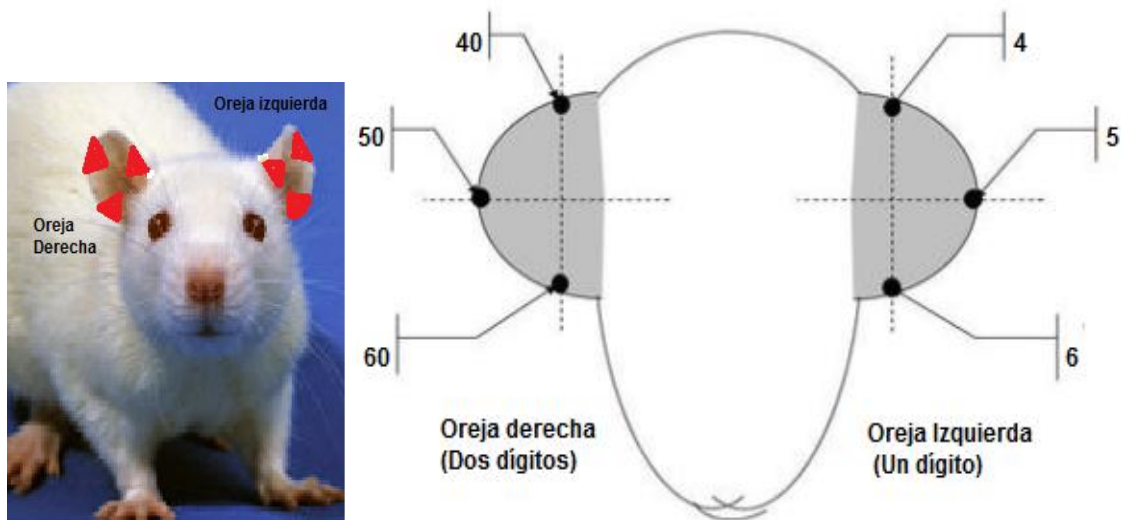


Ilustración 20: Marcaje¹¹

2.7.4 Cirugía

En forma paralela al procedimiento quirúrgico (Vea Anexo N° 5) se elaboró una tabla para identificación de los animales, su peso, su edad, el tipo de pieza implantado en cada pata, la anestesia recibida y todas las observaciones detectadas en cada una. Así, a la hora del análisis de los huesos, luego del sacrificio, se sabría con exactitud lo sucedido en cada una (Ver Tabla 1).

Como se observa en la tabla 1, la pata izquierda de la rata 4 no posee implante, esto se debió a que accidentalmente se rompió una vena en el área incisión por lo cual el animal se encontraba con una gran hemorragia durante el procedimiento, lo que llevó a tomar la decisión de suspender la cirugía del lado izquierdo para que la rata se pudiese recuperar favorablemente.

Los animales n° 44, 45 y 60 poseen dos piezas de Ti denso del lado izquierdo, ya que luego de la trepanación y colocación de uno de los implantes, este no se podía visualizar a simple vista y surgió la duda de si se encontraría en la médula del fémur o se había perdido entre los músculos del área abierta. Por lo tanto se dispuso en el momento agregar otra pieza en el mismo lugar. Lo mismo ocurrió en la pata derecha de las ratas n° 6 y 56 ambas con dos piezas Ti-P cada una.

¹¹ De Los Santos Hernández R, Toquero Elizalde LA, Urban Cruz LA. Normatividad en el uso de animales. [En línea] 2005 [Fecha de acceso 2 de julio de 2016]. URL disponible en: <http://bioetica-fez.wikispaces.com/Anexos>.

RATA Nº	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 + Éter	Presión ejercida sobre pata derecha
40	11	410	Ti	Ti-HA	Hidrato de Cloral + Éter	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 + Éter	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	

Tabla 1: Datos quirúrgicos

En los animales n° 6, 40 y 45 se aplicó una presión manual en el hueso para que pudiese entrar la pieza debido a que probablemente la trepanación no fue realizada longitudinalmente. En cada una de ellas el tiempo de cirugía fue casi el doble de lo normal. También se utilizó más tiempo en la rata n° 54.

2.7.5 Postoperatorio mediato e inmediato

La recuperación de la anestesia por Hidrato de Cloral debe de ser relativamente rápida, aproximadamente entre 30 y 45 minutos. La pérdida de la temperatura corporal durante la anestesia produce que el animal tarde más en recuperarse.

La temperatura ambiente debe ser constante de 28 grados centígrados, y puede agregarse una fuente adicional, más directa, durante las primeras horas. En cuanto a la disposición, es importante que las cajas no queden en el piso, sino que se coloquen sobre una mesada.

En esta experiencia, para contrarrestar los problemas de tiempo de recobro de reflejos, se debió mantener un área chica bien calefaccionada con estufa que permitió mantener la temperatura corporal a niveles no tan bajos, generándose de esta manera una recuperación más rápida.

En cuanto al seguimiento postquirúrgico de las semanas siguientes (seguimiento mediato), luego de las primeras 24 horas, los animales pasaron a ser alojados en el Bioterio de la FCEFyN, manteniéndose el régimen de temperatura constante y alimentación balanceada.

Se propuso realizar 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.

2.8 Sacrificio

Transcurridas las 4 semanas posteriores a las cirugías, donde el tiempo es necesario para probar el material del implante, 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 e identificados con nombre y fecha (vea Ilustración 21).

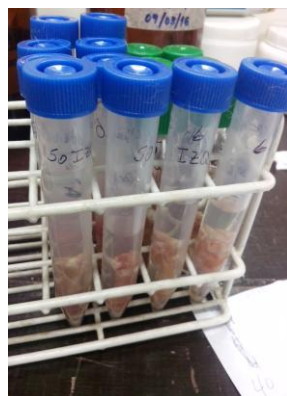


Ilustración 21: Muestras en formol

2.9 Primera valoración de las muestras

La evaluación de la muestras tiene como fin detectar si hay adhesión o no de la pieza al hueso, además de valorar el estado del hueso según se encuentre normal, con callo óseo o callo fibroso.

Para dicha evaluación se utilizó el tacto, estudios radiográficos y por último la observación con lupa estereoscópica.

2.9.1 Radiografías

Se realizaron radiografías en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba utilizando un Equipo Odontológico de RX.

Se efectuaron 24 en total (una para cada fémur intervenido) las cuales se mantuvieron bajo las mismas condiciones, siendo la distancia del emisor a la placa de 8 cm, el tiempo de exposición de 1s, el amperaje de 10 mA y voltaje de 80 kV (Vea Anexo N° 6).

Las placas radiográficas utilizadas fueron de 3cm x 4 cm (para radiografías intraorales).

Este paso sirvió para visualizar el lugar y adherencia de la pieza dentro del hueso, detectar tipo de reparación ósea por presencia de callos y fracturas, y por último analizar área de peri-implantación por radiolucidez.

2.9.2 Análisis con Lupa estereoscópica

Las 19 muestras seleccionadas para ser analizadas por el microscopio electrónico, fueron observadas antes mediante lupa estereoscópica (*ST-30-2L, Konus, China*). Allí se pudo detectar adherencias entre el implante y la corteza, entre el implante y la médula y entre la HA y el tejido.

Se tomaron tres imágenes representativas a 40x para ilustrar (vea Ilustraciones 40, 41 y 42). La mismas fueron digitalizadas mediante una cámara de video (*Moticam3, Motic, China*) y conectada a una computadora.

2.10 Preparado de muestras para Microscopía Electrónica

Para la observación de muestras mediante lupa estereoscópica y la evaluación de la interfase hueso-implante por medio de la determinación del BIC y del análisis de elementos químicos, se debieron someter las muestras a un proceso de preparación con el objetivo de dejarlas aptas para la obtención de imágenes mediante el Microscopio Electrónico de Barrido.

El procedimiento empleado (vea tabla 2) se extrajo de distintas investigaciones donde fueron utilizadas piezas biológicas para análisis microscópico [22, 40, 68, 69, 80, 81]. Además se tomó como referencia el método adaptado en el proyecto integrador precedente [1].

Luego de la extracción de los huesos del animal, se procedió a la “fijación” en formol durante 20 días, lo cual se realizó en tubos plásticos bien identificados.

El siguiente paso fue la “deshidratación” (Vea Ilustración nº 22) que se llevó a cabo en tubos de vidrio y en cuatro días consecutivos, donde en el primero las muestras reposaron 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 al siguiente con monómero 100% concluyendo esta etapa del procedimiento.

Seguidamente, la “inclusión” se realizó en resina poliéster (*Resina pre-acelerada P101510, Todo Droga, Córdoba, Arg.*), conteniendo 1% v/v de catalizador en un recipiente plástico de 13 mm de diámetro (Vea Ilustración nº 23).



Ilustración 22: Deshidratación de las muestras



Ilustración 23: Inclusión de las muestras

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 comenzó con el pulido por el método de desgaste utilizando papel abrasivo de granulometría decreciente (220, 600, 800, 1200 y 2000) con pulidora automática (*Pulidora metalográfica, PUL-01, Prazis, Argentina*). Se desbastó hasta descubrir una sección de la pieza implantada y luego se trabajó con la vista de la misma observando al mismo tiempo con lupa estereoscópica (Vea Ilustración 24).

PROCEDIMIENTO	DESCRIPCIÓN	DURACIÓN
Fijación	Formol 10%	Aprox. 20 días
Deshidratación	Acetona- Agua destilada 50%	24 hs
	Acetona 100%	24 hs
	Acetona- Monómero 50%	24 hs
	Monómero 100%	24 hs
Inclusión	Resina poliéster (monómero y catalizador)	24 hs
Corte	Sierra de mano Torno	-
Pulido	Lija al agua (tamaño de grano decreciente 220-2000)	-

Tabla 2: Pasos para la preparación de muestras¹²

¹² Tabla adaptada de Amietta J, Boezio L. Diseño e implementación de modelo experimental in vivo para evaluar Ti como material de reemplazo óseo. FCEfyN-UNC; 2015 [1].

Debido a las dimensiones de la plátina del microscopio electrónico y del tiempo empleado por el mismo para hacer vacío, las dimensiones de las muestras debían ser de 14 mm de diámetro por 6 mm de alto (Vea Ilustración 25).

Una vez preparadas las muestras en el laboratorio, se realizó el último paso antes de que las muestras puedan ser observadas en SEM. Este consistió en la aplicación de una cubierta de carbono con el objetivo de agregar conductividad que permita la obtención de imágenes.



Ilustración 24: Muestras desbastadas y pulidas Ilustración 25: Muestra de 14mm diám. x 6mm alto

2.11 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Análisis Elemental (EDS)

Posterior al metalizado y a la ejecución de vacío sobre las muestras, se aplicó la técnica de detección de electrones retrofundidos (BS-SEM) para la obtención de imágenes (Anexo N° 7) seguido de la realización del análisis elemental (EDS-SEM) para la caracterización de elementos químicos presentes (Anexo N° 8).

El proceso completo fue llevado a cabo en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X (LAMARX) de la Facultad de Astronomía, Matemática y Física (FaMAF) [82], utilizando el microscopio electrónico disponible (*FE-SEM Sigma, Carl Zeiss, Alemania*).

2.11.1 Medición de BIC

A partir de las imágenes SEM a 50x y mediante el empleo de un software libre para procesamiento de imágenes científicas llamado *Fiji*, se tomaron los perímetros de todas las piezas implantadas y luego sobre cada una se tomó la longitud de contacto implante-hueso (Vea ilustración n° 26).

El siguiente paso fue la determinación del BIC [%] sobre cada uno haciendo uso de la fórmula n° 6.

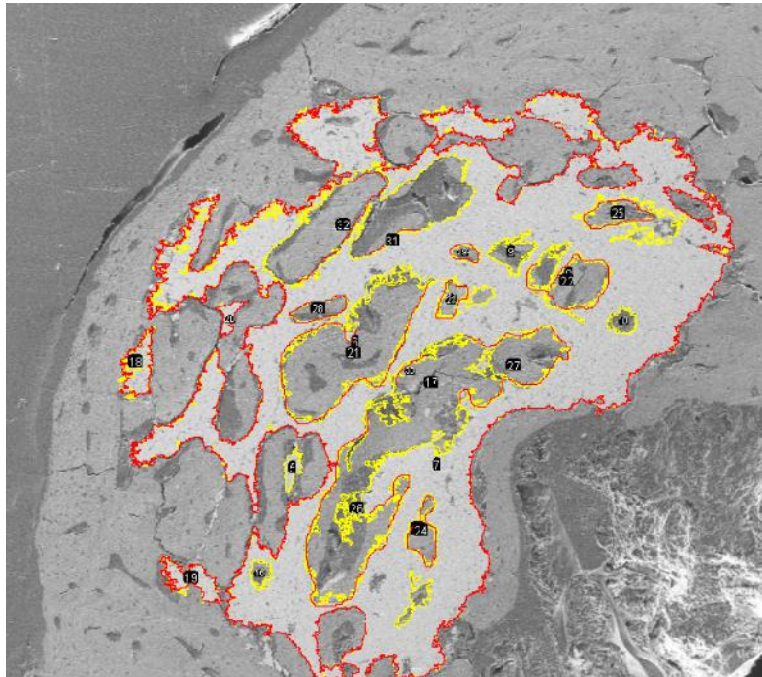


Ilustración 26: Medición de perímetros en muestra 44dP

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

Ecuación 6: Ecuación para el cálculo porcentual del BIC

2.11.2 Análisis de EDS y relación Ca/P

Como se mencionó en la sección 1.3, las células responsables de la formación de nuevo hueso se conocen como osteoblastos y las responsables de la reabsorción del hueso son los osteoclastos (destructoras del hueso). Los osteoblastos secretan los componentes orgánicos del hueso (osteóide) que posteriormente, siempre que exista una cantidad suficiente de calcio y fosfato en el líquido extracelular, se mineralizan.

Por lo tanto en la realización de las imágenes mediante análisis EDS se propuso buscar los elementos químicos que componen la matriz mineral. La aplicación del mapeo de elementos químicos es útil para demostrar cómo se efectúa la distribución del calcio y fósforo en el callo óseo, en comparación con el hueso cortical en el que hay una distribución densa y homogénea, mientras que en el callo hay zonas aún sin osificar, debido a que no ha terminado el proceso de la consolidación ósea [83, 84, 85, 86].

Para caracterizar el hueso formado en la cercanía de la pieza calculamos la relación Ca/P tomando como referencia el valor para la hidroxiapatita (1,67) y considerando que valores por encima de él corresponden a la formación de nuevo hueso, mientras que por debajo significaría resorción.

Para cada material implantado se calculó la media de las relaciones Ca/P con el fin de poder establecer que biomaterial utilizado cumplió en mayor o menor grado con dos de sus propiedades, la **osteoinductividad** (estimulación a la osteogénesis) y la **osteconductividad** (provisión de un ambiente, estructura o matriz física apropiada para la aposición de hueso nuevo).

2.12 Evaluación mediante análisis estadístico

En el punto 1.9 se describieron algunas de las técnicas estadísticas que se usan actualmente y de las cuales hicimos uso para comparar el desempeño de las piezas “control” con las piezas “problema”.

Luego de la obtención de los porcentajes de BIC para cada muestra, donde los resultados cuantitativos de la oseointegración, observados a simple vista, evidenciaban una tendencia hacia el Ti-P por poseer éste los valores más altos del contacto implante-hueso, se decidió realizar un análisis particular sobre los BIC cada material mediante estadísticos descriptivos (media, mediana, varianza, límites, rango) y diagramas de caja con el fin de evaluar los desempeños de cada uno luego de la implantación [80] y comprobar si realmente había mejor actuación en las muestras de titanio poroso al igual que las deducciones obtenidas mediante el análisis elemental. Los software estadísticos utilizados fueron *SPSS* e *Info Stat*, ambos de uso libre.

Una vez determinado el material que mejor actuación tuvo, en cuanto a la adherencia e integración al hueso, para evaluar si las diferencias encontradas entre los valores de los materiales de ensayo y control eran estadísticamente significativas como para afirmar una mejor relación hueso-implante en un tipo de pieza, 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%.

La prueba se aplicó en dos casos con el objetivo de estudiar y comparar el comportamiento de Ti denso-grupo1 vs Ti poroso y Ti denso-grupo2 vs Ti-HA. Se plantearon dos hipótesis para cada uno donde se buscó afirmar una y rechazar otra:

- **H0**: no existe diferencia significativa entre la media de porcentaje de BIC de Ti control y de Ti problema.
- **H1**: existe diferencia significativa entre la media de porcentaje de BIC de Ti control y de Ti problema.

Capítulo 3: Resultados

En cada paso de este trabajo experimental se obtuvieron resultados que, en última instancia nos permitieron lograr la sistematización del modelo experimental *in vivo* para evaluar el desempeño del Ti y Ti-HA como reemplazo óseo.

Se desarrollan a continuación los resultados de cada etapa.

3.1 Piezas sinterizadas

Luego de dos intentos frustrados de sinterizado, debido al uso de prototipos de soportes no adecuados, se logró un buen ciclo térmico utilizando los estuches de cuarzo. Mediante un análisis superficial haciendo uso de Lupa estereoscópica (*ST-30-2L, Konus, China*) con aumento 40x, se comprobaron los buenos resultados obtenidos (Vea Ilustración 27, 28 y 29).

Las medidas finales en todos los implantes fueron de aproximadamente $1,6 \pm 0,06$ mm de diámetro y $1,5 \pm 0,1$ mm de alto.

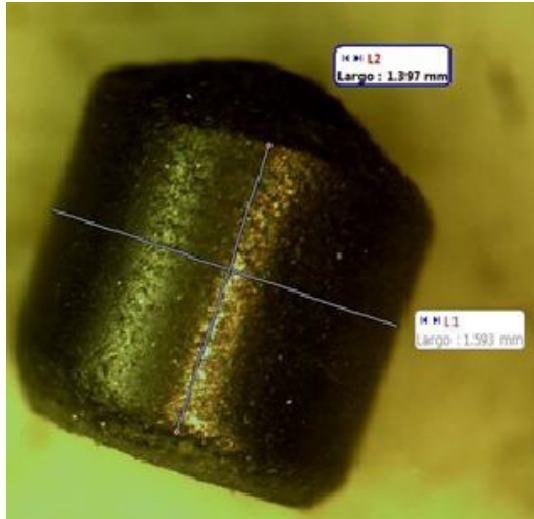


Ilustración 27: Pieza de Ti denso

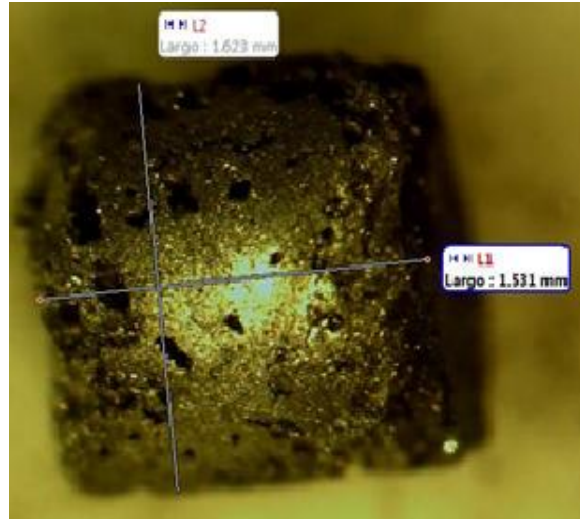


Ilustración 28: Pieza de Ti poroso

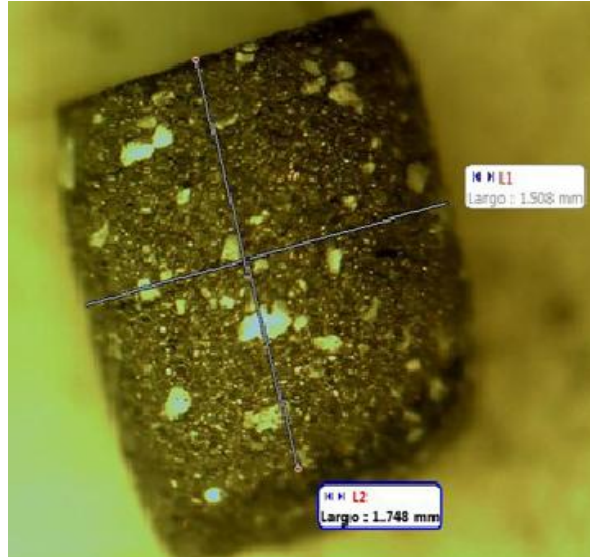


Ilustración 29: Pieza de Ti- HA

3. 2 Resultados de Metalografía

La técnica metalográfica fue realizada para comprobar la correcta sinterización de las piezas a ser implantadas.

Según trabajos de investigación, a los 800 °C el Titanio logra una correcta sinterización y a medida que se aumenta la temperatura se obtienen mejores resultados en ciertas propiedades y los poros del polvo se van haciendo más pequeños [19].

La pieza de Ti-HA se muestra en la ilustración nº 30, las partes más claras corresponden al Ti y las más oscuras a las partículas de HA distribuidas en él. Se comprueba que el sinterizado a 800 °C es correcto debido a que el Ti logra una buena compactación.

En cuanto a las piezas de Ti poroso a 800 °C (vea Ilustración 31) se evidenció un excelente resultado, se obtuvieron poros grandes y bien definidos, mientras que el Ti que los rodea muestra un buen sinterizado con microporos adecuados.

Por último, las piezas de Ti denso son observadas x1000 donde se visualizan los diminutos poros resultantes de la baja temperatura para el sinterizado, ya que a 1200°C estos no existirían (vea Ilustración 32).

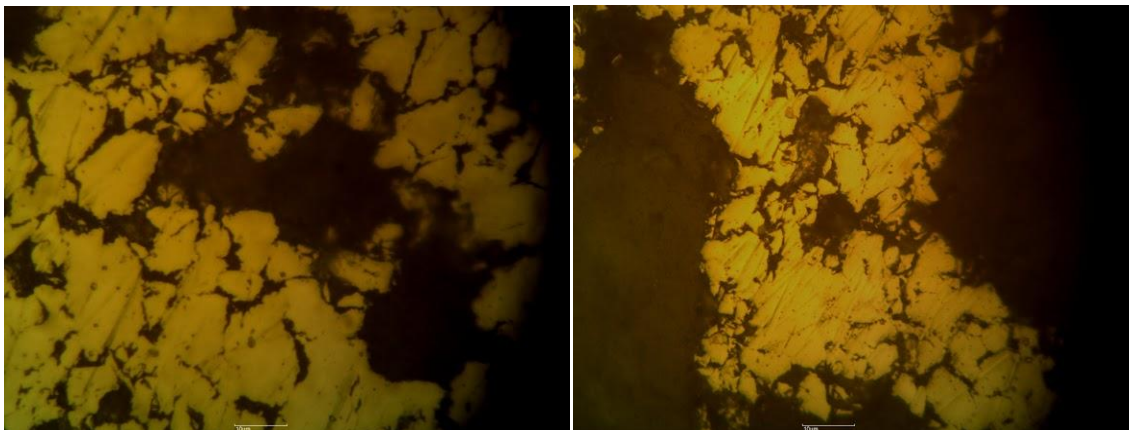


Ilustración 30: Pieza de Ti-HA con ciclo térmico hasta 800 °C

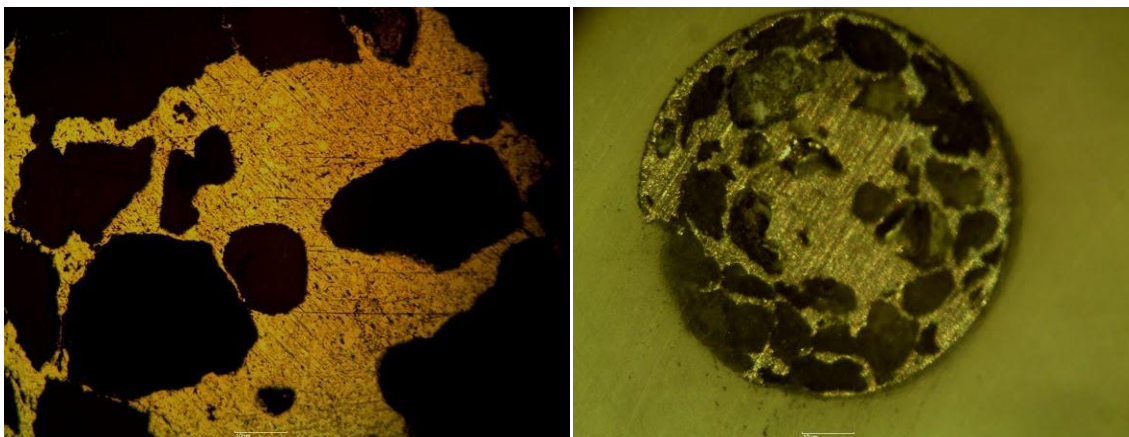


Ilustración 31: Ti-P sometido a ciclo térmico hasta 800 °C

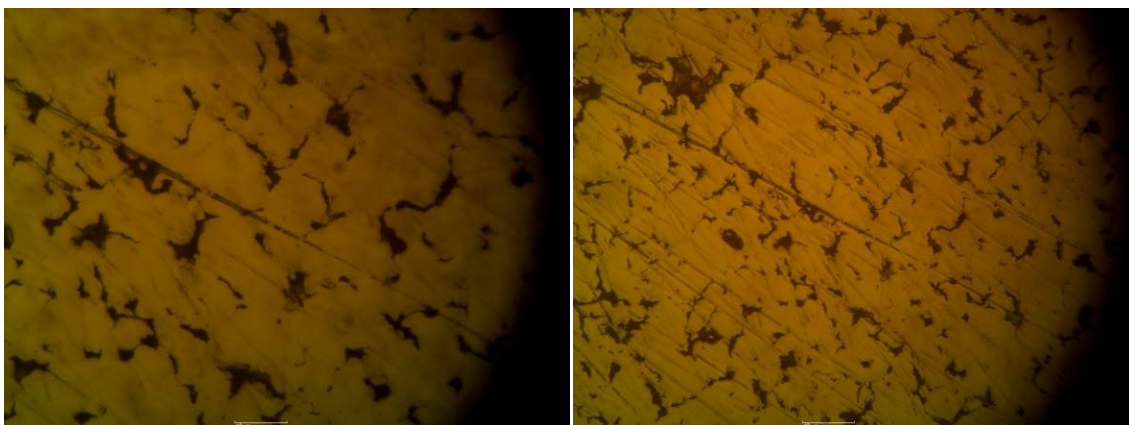


Ilustración 32: Pieza de Ti denso sinterizada a 800 °C

3.3 Conclusiones de la prueba preliminar

Se realizó aplicación de los pasos de trepanación del fémur y colocación de la pieza perteneciente al procedimiento quirúrgico sobre una rata muerta y congelada. Se utilizaron dos tamaños de fresa (1,5 mm y 2 mm) para probar adaptación del implante al orificio.

Se concluyó que el tamaño ideal de la fresa para una trepanación correcta sería de 1,5 mm. Se puede observar en la Ilustración n° 33 el perfecto orificio sobre el fémur con la pieza de titanio en su interior.



Ilustración 33: Prueba de trepanación e inserción del implante.

3.4 Resultados del post-operatorio

A continuación se muestra la tabla de observaciones y pesos confeccionada en las visitas al bioterio durante las semanas posteriores a las cirugías con el fin de detectar anomalías o traumas en los animales debido al procedimiento quirúrgico al que fueron sometidos (ver tabla n° 3).

El peso se tomó la segunda semana del post-operatorio y el resto de los parámetros son promedio de las 4 semanas antes del sacrificio.

Se observa que en la segunda semana la mayoría de las ratas disminuyó o mantuvo su peso, que pudo deberse a que se encontraban aún doloridas y desganadas.

Para registrar el andar se identificó a las ratas por caja y se las observó aproximadamente 5 min a cada una dos veces a la semana. Así pudimos ver que las ratas 40 y 45 poseían un andar dudoso y por momentos tendían a arrastrar una de sus patas.

El resto de los parámetros evaluados se encontraron normales durante las cuatro semanas del post-operatorio, los animales mantuvieron una hidratación como la que tenían habitualmente antes de la cirugía, la alimentación disminuyó poco la primera semana pero luego se normalizó. En el pelaje no se encontró cambio de ningún tipo.

RATA Nº	PESO (gr) SEMANA 1	PESO (gr) SEMANA 2	HIDRATACION	INGESTA DE ALIMENTO	PELAJE	ANDAR
4	440	450	Normal	Normal	Normal	Normal
5	350	357	Normal	Normal	Normal	Normal
6	380	372	Normal	Normal	Normal	Normal
40	410	400	Normal	Normal	Normal	Dudoso
44	370	380	Normal	Normal	Normal	Normal
45	385	385	Normal	Normal	Normal	Dudoso
46	344	376	Normal	Normal	Normal	Normal
50	403	408	Normal	Normal	Normal	Normal
54	497	502	Normal	Normal	Normal	Normal
55	357	361	Normal	Normal	Normal	Normal
56	442	445	Normal	Normal	Normal	Normal
60	397	400	Normal	Normal	Normal	Normal

Tabla 3: Seguimiento post-operatorio

3.5 Muestras extraídas

Luego del sacrificio se procedió a extraer los fémures de las ratas, identificarlos y guardarlos en frascos con formol.

Además se realizó una valoración utilizando el tacto y la visión, detectando posibles lugares de la pieza, formaciones de callos y fracturas.

Se confeccionó una tabla donde se registró el peso del animal al momento del sacrificio, la edad, el estado del hueso y el estado de la pieza respecto al tejido (vea Tabla nº 4).

En cuanto al peso, se observó que todas las ratas evidenciaron un aumento pero en distintas proporciones. Los valores más bajos fueron en la rata nº 40, que solo aumento 20 gr en las cuatro semanas, la nº 6 con un aumento de 70 gr y la nº 45 con 75 gr. Las tres coinciden con aquellos animales que poseían callos en el fémur, notables a simple vista. El resto tuvo un incremento de peso entre 80-112 gr, que es normal en el período de vida en el que se encontraban en ese momento (adultez). En general, todas se encontraron entre 430-522 gr a la hora de la eutanasia.

En cuanto al estado del hueso, siguiendo con la codificación establecida en el diseño del modelo experimental [1], se valoró según tres categorías: apariencia normal (OK), presencia de callo osificado (CO) o de callo fibroso (CF). Para evaluar el estado pieza-tejido de manera visual se utilizó A para aquellos casos en que la pieza esta adherida al hueso y NA para lo contrario.

En las Ilustraciones Nº 34 y 35 se muestran dos casos donde la pieza esta adherida al hueso sin haber provocado ningún tipo de lesión ni trauma. En uno de los casos, el implante se encuentra dentro del hueso mientras que su superficie se ha regenerado completamente dejando solo una pequeña mancha. El otro caso es uno de los huesos en donde se implantaron dos piezas, una encima de la otra, por lo tanto la última se observa desde el exterior.



Ilustración 34: Muestra 55 derecha (Ti-HA)



Ilustración 35: Muestra 60 izquierda (Ti)

RATA	EDAD (semanas)	PESO (gr)	PATA IZQUIERDA		PATA DERECHA	
			HUESO	Ti	HUESO	Ti-P/Ti- HA
4	15	530	-	-	OK	A
5	15	460	OK	A	OK	A
6	15	450	OK	A	CO	A
40	15	430	CO	A	CO	NA
44	15	450	OK	A	OK	A
45	15	490	OK	A	CO	A
46	15	456	OK	A	OK	A
50	15	453	OK	A	OK	A
54	15	590	OK	A	OK	A
55	15	455	OK	A	OK	A
56	15	522	OK	A	OK	A
60	13	480	OK	A	OK	A

Tabla 4: Descripción de muestras luego de la extracción

3.6 Resultados de Placas Radiográficas

Mediante análisis visual de las placas (disponibles en Anexo N° 6) se pudo identificar el lugar de la pieza dentro del fémur (corteza o médula) y además, hacer una valoración cualitativa detectando radiolucidez o radioopacidad peri-implantar, que significa presencia de tejido blando o tejido óseo respectivamente. También se identificó el tipo de remodelado óseo que se estaba efectuando, ya sea primario o secundario.

Para nombrar las muestras se designó en primer lugar un número según la rata a la que perteneció el fémur, seguido de una letra minúscula (i ó d) correspondiente a izquierdo o derecho, y por último las siglas D, P ó HA en mayúscula para denso, poroso o con hidroxiapatita.

Entonces podemos decir que:

- En las muestras 6dP (con dos piezas de Ti-P), 40iD, 40dHA y 45dHA (vea Ilustración n° 36) se evidenciaron fracturas. Sólo en una de ellas (40dHA) la pieza se encontró fuera de lugar, mientras que en el resto se mantuvo adherida a alguna porción del hueso.
- Las muestras 5iD, 6iD, 44dP, 45iD (dos piezas, vea Ilustración n° 37), 56iD y 60iD (dos piezas implantadas) se encuentran adheridas al hueso en sus dos porciones, cortical y medular.
- 4dP, 5dHA y 46iD (Vea Ilustración n° 38) están adheridas a la porción cortical del hueso, se evidencia perforación superficial.
- 44iD (dos piezas), 46dP, 50iD (vea ilustración n° 39), 50dHA, 54iD, 54dP, 55iD, 55dHA, 56dP (con dos piezas) y 60dHA se encuentran dentro del hueso, en la médula y sin exhibir perforación superficial.



Ilustración 36: Muestra 45dHA



Ilustración 37: Muestra 45iD



Ilustración 38: Muestra 46iD



Ilustración 39: Muestra 50iD

En cuanto al análisis cualitativo de las placas mediante observación de los bordes peri-implantares, los resultados fueron pocos claros debido a la baja calidad de las imágenes radiográficas.

De las diecinueve piezas que no se fracturaron, se observó ausencia de borde radiolúcido rodeando a la pieza implantada en diecisiete, mientras que en las dos restantes (54dP y 56dP) se estableció como dudoso por no poder visualizarse con claridad (Vea tabla nº 5).

La ausencia de un borde radiolúcido periimplantar significa ausencia de tejido blando y por lo tanto buen desenvolvimiento del implante. Se pretendió verificar este método en las diecinueve muestras no fracturadas mediante imágenes microscópicas.

La reparación ósea fue distinta en las muestras en que hubo fractura y en las que no. En los cuatro casos donde el fémur se fracturó se formó un callo óseo, por lo tanto la remodelación en curso estaba siendo de tipo secundaria. En las diecinueve muestras restantes el remodelado óseo fue de tipo primario regenerándose completamente la corteza en el sitio de trepanación (vea ejemplos en ilustraciones 34 y 35).

Nº ANIMAL	BORDE RADIOLÚCIDO		TIPO DE REPARACIÓN	
	Izquierda	Derecha	Izquierda	Derecha
4	NO	NO	-	1º
5	NO	NO	1º	1º
6	NO	NO	1º	2º
40	NO	NO	2º	2º
44	NO	NO	1º	1º
45	NO	NO	1º	2º
46	NO	NO	1º	1º
50	NO	NO	1º	1º
54	NO	DUDOSO	1º	1º
55	NO	NO	1º	1º
56	NO	DUDOSO	1º	1º
60	NO	NO	1º	1º

Tabla 5: Análisis de placas radiográficas

3.7 Análisis mediante Lupa Estereoscópica

La realización de fotomicrografías a 20x sobre las diecinueve muestras seleccionadas mediante las placas radiográficas, permitió la identificación las interfases hueso-implante de cada una.

Las ilustraciones nº 40, 41 y 42 corresponden a las muestras 5iD, 46dP y 5dHA respectivamente. Por sus características fueron seleccionadas como representativas de las restantes.

En la primera se puede ver una pieza de titanio denso adherida totalmente a la corteza ósea, sin embargo a simple vista no se observa diferencia en el tejido peri-implantar, es decir que la interfaz no puede ser observada a este aumento.

La ilustración 41 corresponde a un implante de titanio poroso con gran parte de su superficie en contacto con la corteza, quien a este aumento y juzgando por su color homogéneo, parece haberse conformado hueso a su alrededor y por dentro de los poros sin ninguna particularidad detectable.

Por último, la ilustración 43 (de titanio e hidroxiapatita) al igual que las anteriores se observa bien integrada al hueso mientras que la corteza se encuentra a su alrededor sin cambios negativos.

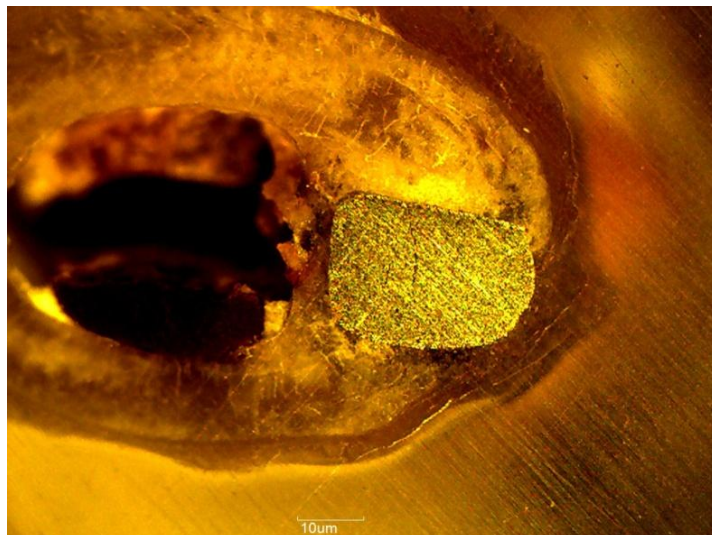


Ilustración 40: Fotomicrografía 5iD



Ilustración 41: Fotomicrografía 46dP

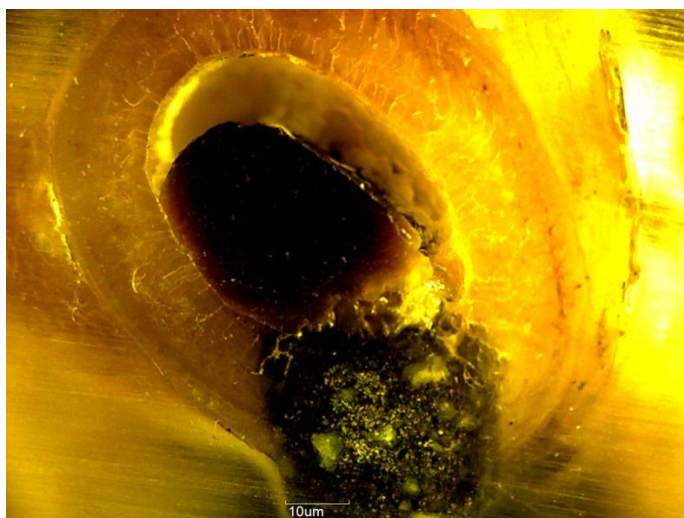


Ilustración 42: Fotomicrografía 5dHA

Las muestras restantes fueron estudiadas de la misma manera permitiendo la confección de una tabla (Vea Tabla nº 6) con los posibles resultados a ser evaluados (confirmados o refutados) a través del SEM.

Se indican con TO las interfaces compuestas por tejido óseo y con TF las conformadas por tejido fibroso.

MATERIAL	MUESTRA	INTERFAZ
Titanio Denso	5iD	TO
	6iD	TO
	44iD	TO
	45iD	TO
	46iD	TO
	50iD	TO
	54iD	TO
	55iD	TO
	56iD	TO
	60iD	TO
Titanio Poroso	4dP	TO
	44dP	TO
	46dP	TO
	54dP	TO
	56dP	TO
Titanio e Hidroxiapatita	5dHA	TO
	50dHA	TO
	55dHA	TO
	60dHA	DUDOSO

Tabla 6: Resultados de fotomicrografías con lupa estereoscópica

3.8 Microscopía Electrónica de Barrido y Análisis elemental EDS

Las imágenes BS-SEM y el análisis elemental de cada muestra se exponen en los Anexos N° 7 y N° 8 respectivamente.

Mediante las imágenes BS-SEM se pretendió evaluar de manera cualitativa y cuantitativa a la implantación y determinar con mayor exactitud la calidad de las interfases hueso-implante de cada una de las muestras para, finalmente comparar con los resultados arrojados mediante la observación de las fotomicrografías [83, 87, 88, 89].

A pesar de que el período de cirugía-sacrificio fue relativamente corto (4 semanas), se observó crecimiento del hueso en todos los implantes, cerrando el orificio por donde se introdujo la pieza.

En las piezas de Ti-P se evidenció gran crecimiento de hueso en los poros, mostrando los más pequeños completamente regenerados y gran parte de los más grandes.

No hubo signos macroscópicos o microscópicos de infección, tampoco se observó tejido fibroso en la interfase, con independencia del tipo de muestra. Al existir tejido óseo en la interfaz hueso-implante se pudo comprobar que las piezas condujeron a la osteointegración.

Luego de una observación detallada de cada imagen se confeccionó una tabla con las conclusiones finales (tabla nº 7) por material y por muestra, distinguiéndose con TO a la interfaz de tejido óseo y TF al tejido fibroso.

Con respecto a la tabla confeccionada luego de la observación mediante lupa estereoscópica, aquí se resuelve la duda sobre la pieza 60dHA, que a 20x parecía estar rodeada de tejido fibroso, pero con SEM y EDS se comprobó que sólo era un borde más profundo que el resto, constituido por tejido óseo.

MATERIAL	MUESTRA	INTERFAZ
Titanio denso	5iD	TO
	6iD	TO
	44iD	TO
	45iD	TO
	46iD	TO
	50iD	TO
	54iD	TO
	55iD	TO
	56iD	TO
	60iD	TO
Titanio Poroso	4dP	TO
	44dP	TO
	46dP	TO
	54dP	TO
	56dP	TO
Titanio e Hidroxiapatita	5dHA	TO
	50dHA	TO
	55dHA	TO
	60dHA	TO

Tabla 7: Evaluación de interfaz según BS-SEM

3.8.1 Medición de BIC

Luego de la medición de perímetros de cada muestra (Ilustración n° 26) y del cálculo de los porcentajes de BIC (contacto hueso-implante), se confeccionaron las tablas n° 10, 11 y 12 (Vea Anexo N° 9) para exponer los valores correspondientes a implantes de titanio denso, titanio poroso y titanio e hidroxiapatita respectivamente.

En las muestras de Ti denso se colorean en amarillo los valores que luego formarán parte del grupo 1 a contrastar con el Ti poroso, y en color verde los pertenecientes al grupo 2 a contrastar con los de Ti-HA en la prueba t para muestras apareadas.

3.8.2 Relación Ca/P

Las composiciones porcentuales de Ca y P, y el cociente Ca/P fueron adquiridos de los mapeos completos con la técnica EDS (Vea Ilustración n° 43). Las imágenes obtenidas sobre las 19 muestras seleccionadas se pueden consultar en el Anexo N° 8.

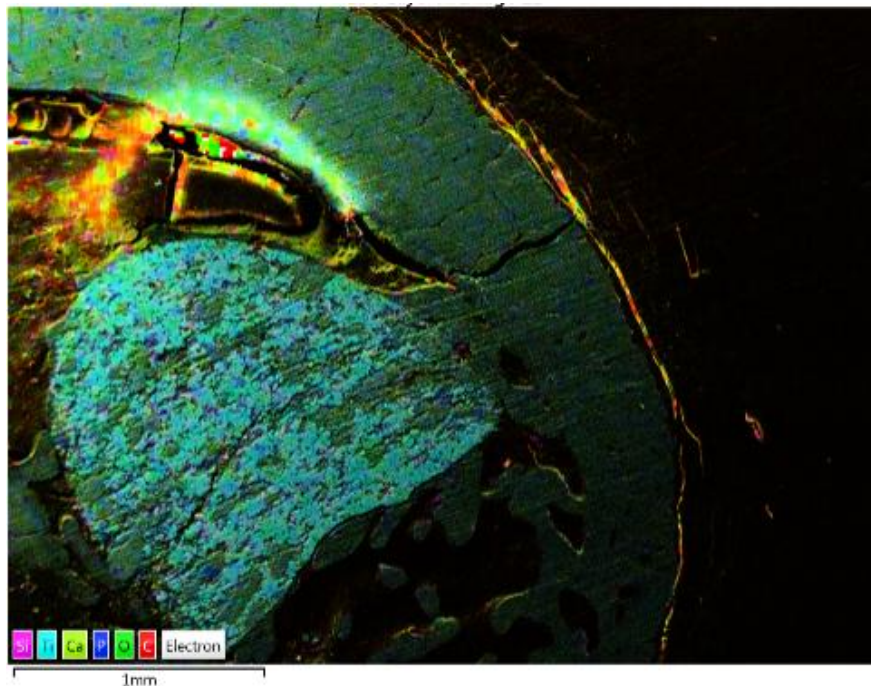


Ilustración 43: Ejemplo EDS-SEM: muestra 50 dHA

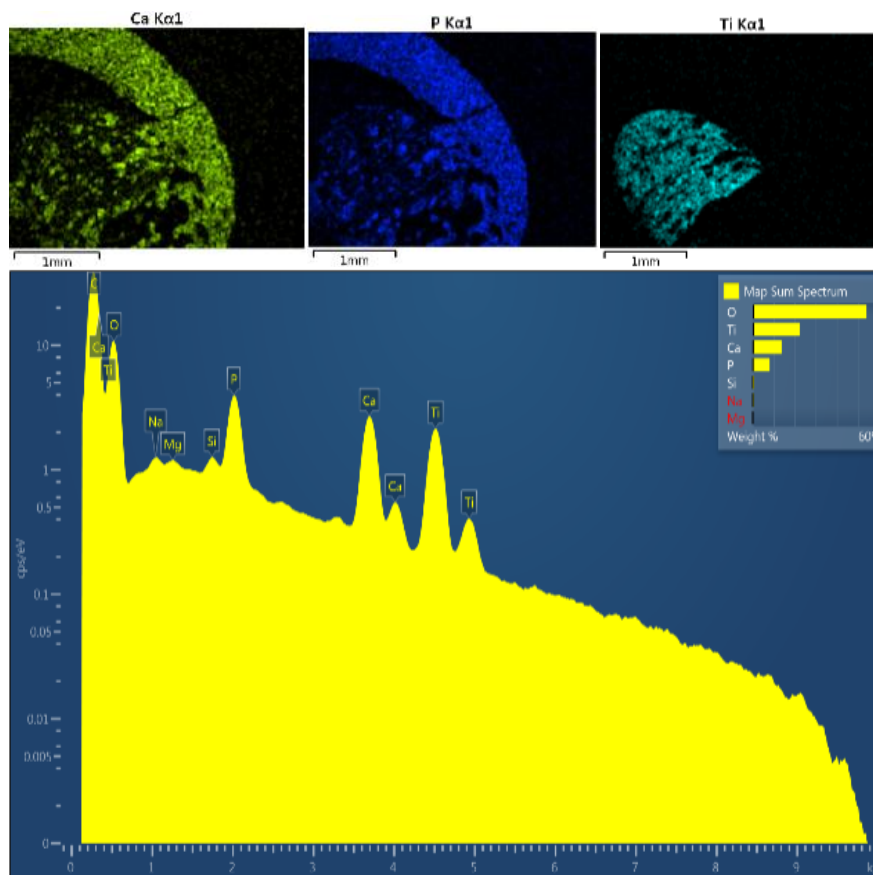


Ilustración 44: Diagrama de distribución elemental: muestra 50 dHA

En la tabla n° 13 del Anexo N° 9 se exhiben los valores obtenidos de las muestras con titanio denso. En las tablas n° 14 y 15, los valores del cociente Ca/P para las muestras de titanio poroso y las muestras de titanio e hidroxiapatita respectivamente.

Con el cálculo de la media de cada grupo de valores Ca/P, se observó que el valor más bajo (**1,57**) fue del titanio denso, seguido del Ti-HA con **1,71** y por último, el más alto, que correspondió al titanio poroso (**1,80**). Comparando con la hidroxiapatita, que es el principal y más abundante cristal de los huesos ya que les confiere su dureza característica, con un ratio Ca/P de 1,67; se puede concluir que tanto en los animales que recibieron implantes de Ti-P como Ti-HA, se evidenció formación de nuevo hueso con gran incremento de calcio y fósforo, comprobando la osteoinductividad y osteoconductividad de los biomateriales por encima del Ti denso.

3.9 Datos estadísticos

A continuación se muestran los resultados obtenidos tanto para la descripción estadística como para la técnica ANOVA y t de Student para muestras apareadas.

3.9.1 Valores estadísticos descriptivos

Para poder comparar las muestras “control” con las muestras “problema” se tomaron los valores de BIC de dos grupos de Ti denso que correspondían a las patas izquierdas de las muestras de Ti poroso y Ti-HA pertenecientes a las patas derechas del mismo animal.

En las tablas 16, 17, 18 y 19 del Anexo N° 10 se detallan los valores estadísticos descriptivos para cada grupo. Con dichos valores se procedió al armado de los gráficos de caja y bigotes (vea ilustraciones 45 y 46) visualizar y comparar los comportamientos de los materiales en cuanto a la integración al hueso.

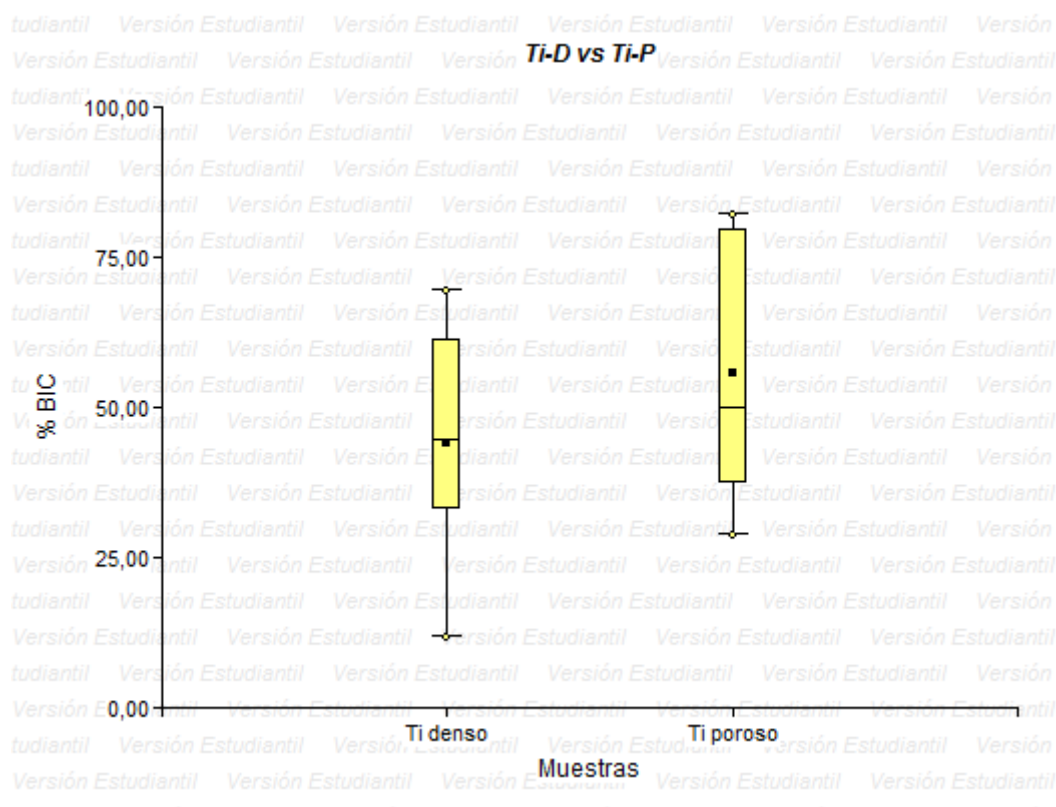


Ilustración 45: Diagrama en caja Ti denso-grupo 1 vs Ti poroso

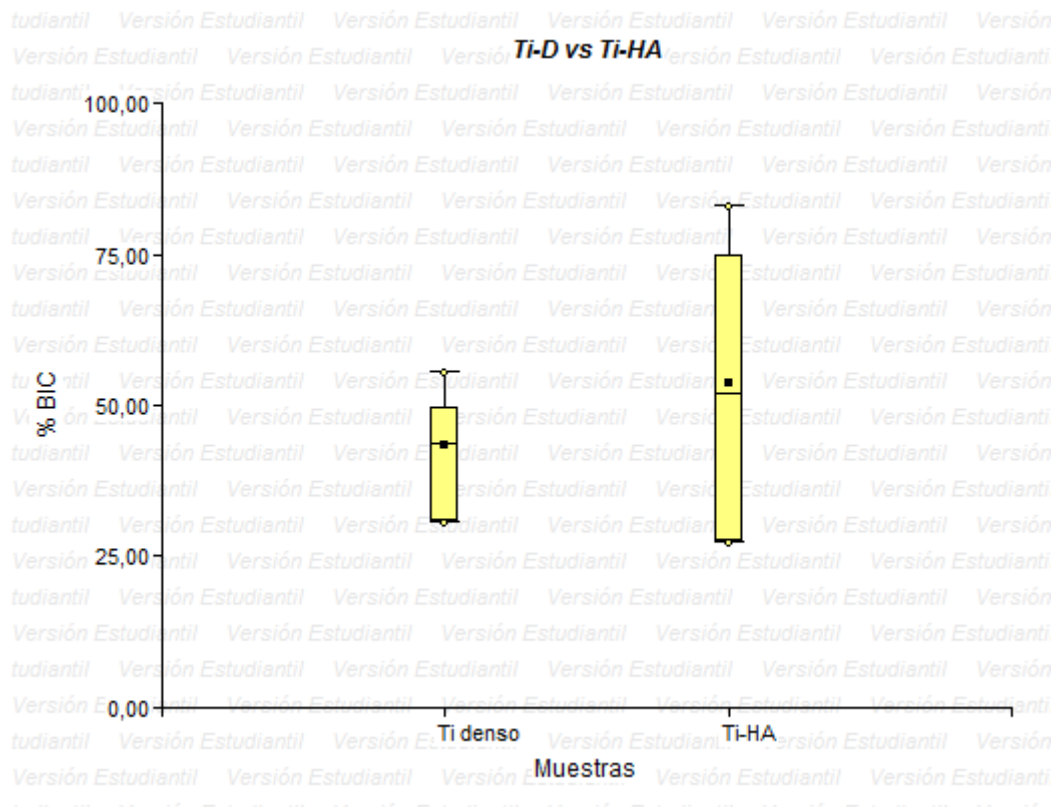


Ilustración 46: Diagrama en caja Ti denso-grupo 2 vs Ti-HA

En el diagrama de caja “Ti-D vs Ti-P” se muestra que:

- Los porcentajes de mayores de BIC (comprendidos entre el 50% y el 75%) de las muestras están más dispersos que los menores (entre el 25% y el 50%).
- El rango intercuartílico ($Q_3 - Q_1$) para el Ti denso es de 28,3; es decir, el 50% de las muestras están comprendidas en un BIC de 28,3. Para el Ti poroso el rango del 50% de los datos es de 42,2.
- La media del Ti denso-grupo1 es cercana a su mediana, en el gráfico están contiguas (44,14% vs 44,60%). En el Ti poroso están muy distantes siendo la media (55,60) mayor que la mediana (49,90).
- En ambos casos la distribución no es simétrica.

Para la segunda comparación, el diagrama de caja “Ti-D vs Ti-HA” evidencia:

- Los porcentajes de BIC comprendidos entre el 25% y el 50% de las muestras están más dispersos que entre el 50% y el 75%. En

el caso de Ti-HA ambos lados de la caja son iguales, la dispersión es igual en los datos del 25% al 75%.

- El rango intercuartílico ($Q_3 - Q_1$) para el Ti denso es de 28,3; es decir, el 50% de las muestras están comprendidas en un BIC de 28,3. Para el Ti poroso el rango del 50% de los datos es de 42,2.
- La media del Ti denso-grupo2 es muy semejante a su mediana, por lo cual en el gráfico están superpuestas (43,45% vs 43,65%). En el caso Ti-HA están apenas distante siendo la media mayor que la mediana (53,75 contra 52,15).
- En las muestras de Ti-HA la distribución es simétrica.

Se concluye que en ambos casos los valores más altos de %BIC se encontraron en los grupos de muestras de Ti-P y Ti-HA asegurando una mejor osteointegración de la pieza en relación al tejido circundante, pero también se evidenció que en esos casos los valores estuvieron más dispersos que en los grupos de Ti-D, incorporando mayor varianza en los resultados.

3.9.2 Prueba ANOVA y t de Student para muestras apareadas

ANOVA: En esta prueba se compararon los valores de BIC de tres grupos de muestras compuestos por los distintos tipos de biomateriales (Ti-D, Ti-P y Ti-HA) para averiguar si las diferencias encontradas mediante estadísticos descriptivos y el análisis elemental eran significativas. Los resultados se muestran en la ilustración n° 47 donde se observa una vez más que los valores más altos de porcentajes de BIC fueron los de Ti-P seguidos por los de Ti-HA con medias muy cercanas.

Los grupos contrastados fueron de distintos “n”, acrecentando el error a medida que el número de muestras desciende.

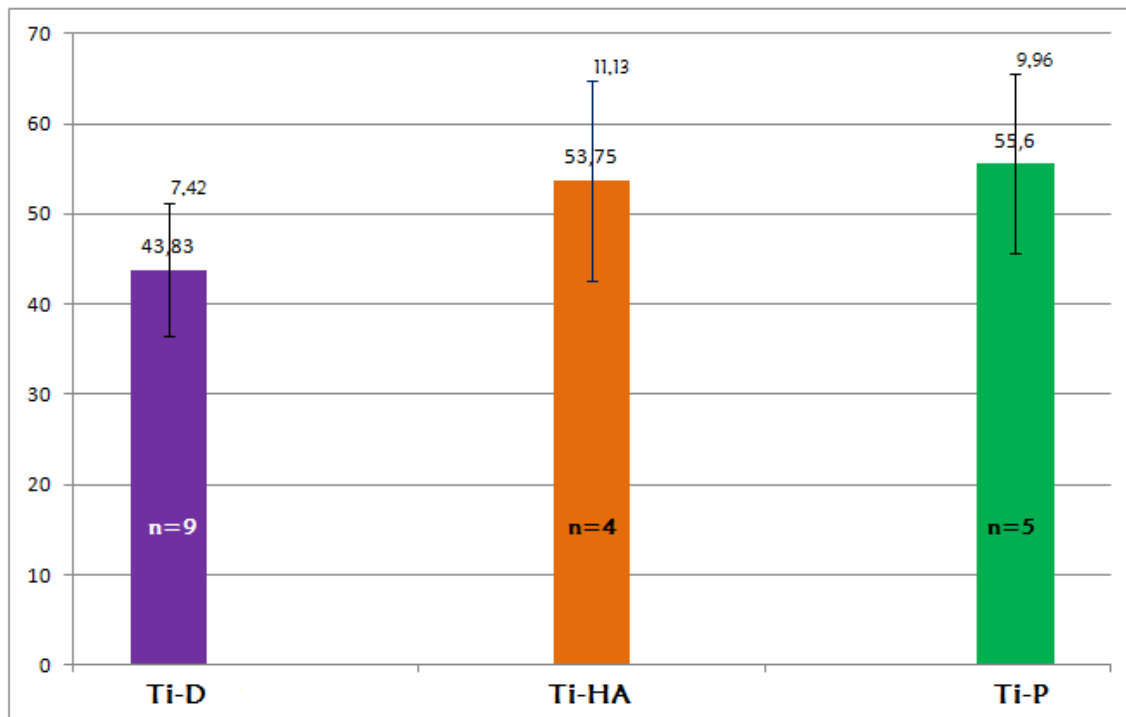


Ilustración 47: Prueba ANOVA

Prueba t de Student para muestras apareadas: se consideró como variable de análisis la diferencia entre los porcentajes de BIC para muestras pertenecientes al mismo animal. Para ello se tomaron dos grupos de Ti denso correspondientes a los “controles” (patas izquierdas) de las muestras de Ti poroso y Ti-HA pertenecientes a los “problemas” (patas derechas) de la misma rata (Vea Ilustración 48 y 49).

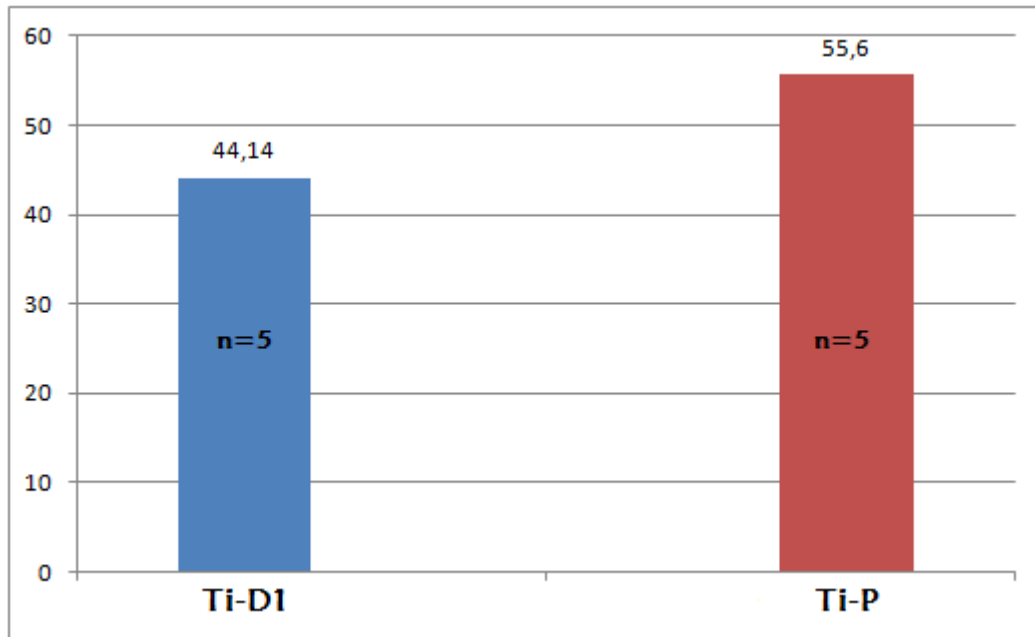


Ilustración 48: Prueba t para muestras apareadas, Ti-D1 vs Ti-P

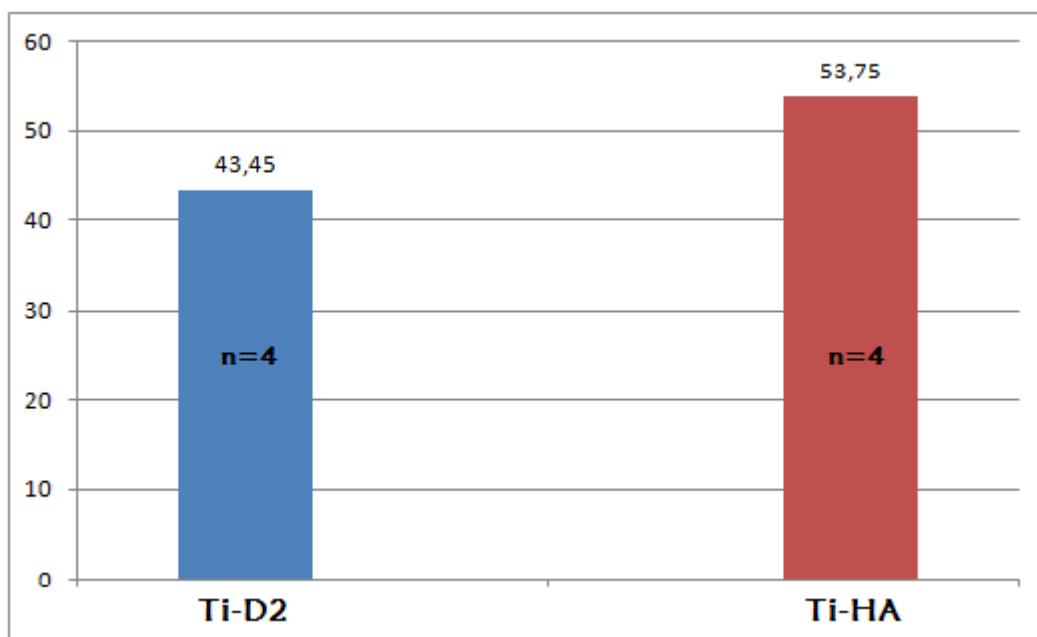


Ilustración 49: Prueba t para muestras apareadas, Ti-D2 vs Ti-HA

Luego de comprobado el cumplimiento de los filtros requeridos por ambas pruebas (normalidad de la población e igualdad de varianzas), en los dos casos planteados se rechazó H_0 , llegando a la conclusión de que si bien **no hay diferencia significativa entre las medias de porcentaje de BIC** de Ti Denso-grupo1 vs Ti Poroso y Ti-HA, si se puede observar una tendencia donde el Ti-HA y el Ti-P tienen mayor resultado positivo que el Ti-Denso.

Capítulo 4: Discusiones

El presente proyecto integrador tiene como fin la sistematización de un modelo experimental in vivo diseñado en un proyecto anterior [1] para la evaluación de piezas obtenidas por la técnica pulvimetalúrgica como biomaterial de reemplazo óseo.

El trabajo consta de tres grandes partes las cuales tienden a cumplir los principales objetivos, tales como la fabricación de las distintas piezas de titanio por pulvimetalurgia, el desarrollo y encuadre regulatorio del procedimiento experimental, que significa que bajo la norma que trata del estudio de las características de la interfaz del implante-hueso, se deba comparar y realizar los cambios pertinentes para su adaptación, y por último, la aplicación de los distintos métodos propuestos para evaluar los desempeños y los resultados de osteointegración de las piezas de Ti denso, Ti poroso y Ti con Hidroxiapatita.

Se abordará entonces la discusión de los resultados obtenidos en tres partes, primero planteando la fabricación de las piezas, luego el modelo experimental propiamente dicho y, al finalizar, la evaluación del comportamiento de los tres tipos de implantes de titanio.

4.1 Discusión sobre la fabricación de piezas implantables

El diseño y la fabricación de la matriz fueron los adecuados para lograr la disminución de las probetas hasta más de un 20% de las realizadas en el proyecto integrador que antecede [1], quedando todas de aproximadamente 1,6 mm de diámetro y 1,5 mm de alto. Además se obtuvieron piezas en verde de manera íntegra y homogénea, eliminando el acabado manual y reduciendo el tiempo de elaboración de cada una de las piezas a solo unos pocos minutos.

El ciclo térmico al que fueron sometidas todas las piezas se logró con tiempos distintos a los utilizados en el trabajo anterior [1] logrando una mayor precisión y mejor sinterizado en cada una de ellas. Asimismo, la mejora en el proceso de debió al nuevo prototipo utilizado, que al tratarse de un estuche cerrado de cuarzo, permitió que las piezas sinterizaran al mismo tiempo y en igual proporción evitando la oxidación.

Se puede afirmar que el gran número de resultados con osteointegración se debe a que al eliminar el acabado manual de la pieza y conservar la terminación superficial rugosa, resultado del proceso de pulvimetalurgia, favorece la adaptación de los implantes y mejora su fijación mecánica.

La metalografía fue de gran utilidad ya que además de ayudar a confirmar que el ciclo térmico finalizado a 800°C es adecuado, permitió afirmar que la técnica pulvimetalúrgica aplicada fue exitosa debido a que se lograron piezas con poros interconectados haciendo uso, además, de espaciadores apropiados. El resultado fue la obtención de excelentes implantes para el crecimiento óseo.

La norma ISO sugiere la esterilización de las piezas sin embargo no se especifica de qué tipo debe ser. En el laboratorio se optó por la realización a calor seco por la disponibilidad de los hornos, cumpliendo los parámetros de tiempo y temperatura, sin embargo en diversos trabajos consultados se aplicaron métodos de esterilizaciones a vapor.

4.2 Discusión sobre el modelo experimental

El diseño del modelo quirúrgico para ratas fue apropiado. Los doce animales intervenidos concluyeron la experimentación sin problemas visibles. Además, el método de acceso quirúrgico al fémur fue exitoso en todos los casos, resultando siempre rápido y sin sangrado significativo.

De los veinticuatro fémures implantados, solo cuatro de ellos sufrieron fracturas que, si nos basamos en el registro de observaciones al momento de las cirugías, se le puede adjudicar a la presión manual ejercida sobre las piezas al ser introducidas en la pequeña perforación sobre el hueso. También puede influir el estado general del animal, ya que por ejemplo uno de los casos, la rata nº 40 sufrió fracturas en ambas patas. A pesar de esto, en todos los fémures, incluidos los fracturados, se observó crecimiento de hueso.

Los remodelados óseos ocurridos fueron los ideales. A través de las placas radiográficas se observó que en las diecinueve muestras no fracturadas se llevó a cabo una reparación ósea primaria, y en las restantes (fracturadas) el remodelado fue de tipo secundario (vea Anexo N°6), con formación de callo óseo.

Los resultados indican que, al igual que en proyecto anterior [1], los pasos del modelo: el acceso quirúrgico, el método usado para la trepanación ósea y el tiempo esperado para que el hueso cicatrice fueron determinados en forma satisfactoria durante el diseño experimental.

Sin embargo, a la vista de las fracturas ocurridas, se considera que tanto en el presente proyecto como en el anterior, ninguno de los protocolos de supervisión aplicados para evaluar el estado de los animales post-operatorio fue suficiente. Si bien se puede establecer una relación con el control del peso en las semanas intermedias, dado que las tres ratas que poseían fracturas no evi-

denciaron un aumento en el rango de las otras (por ej. rata 40: 20 gr vs rata 46: 112 gr), ésta no es concluyente.

El procesamiento de las muestras fue el adecuado para el objetivo propuesto, ninguna de las etapas afectó la valoración de la interfase hueso-titanio. El éxito en la inclusión de las muestras en resina fue tal que no se necesitó realizar una re-inclusión, eliminando esta instrucción de la lista.

En cuanto a la norma ISO 10993-6, el único punto sugerido que no fue seguido es el período de implantación de 12 semanas propuesto para ratas, ya que en nuestro caso, como uno de los objetivos era comparar los resultados con el proyecto integrador que lo antecede [1] entonces se optó por continuar con las cuatro semanas de experimentación. En tanto que, si se respetaron el tamaño de los implantes considerados para roedores, la clausula que expresa que tanto las piezas problema como el control deben implantarse en lugares equivalentes y contralaterales, la trepanación del hueso y la presión manual de las probetas para su inserción.

4.3 Discusión de la evaluación de Ti denso, Ti poroso y Ti e Hidroxiapatita

En la etapa de evaluación de las muestras, la aplicación sucesiva de diferentes métodos de evaluación de menor a mayor complejidad permitió el desarrollo de una valoración cualitativa y cuantitativa de la oseointegración. Además, los resultados obtenidos en las primeras fases permitieron descartar muestras que no servirían al análisis final y sacar conclusiones prematuras que luego se afirmarían o rechazarían con técnicas más eficaces.

Debido a la gran cantidad de resultados positivos comprobados en los huesos luego del sacrificio, se descarta que las fracturas ocasionadas en cuatro de los veinticuatro huesos se deban a una reacción adversa del material constitutivo. En cambio se atribuyen a una cirugía traumática debida a la presión ejercida sobre el hueso contra la fragilidad y el tamaño diminuto del mismo.

Haciendo uso de las placas radiográficas, se detectó que las muestras 6dP, 40iD, 40dHA y 45dHA presentaban fracturas, y sólo en una de ellas (40dHA) la pieza se encontró fuera de lugar, mientras que en el resto se mantuvo adherida a alguna porción del hueso. En todas se formó un callo óseo, por lo tanto la remodelación en curso fue de tipo secundaria.

La ausencia de borde radiolúcido en las placas radiográficas de las piezas es indicativa de que el implante se encuentra oseointegrado, descartando que haya fibrointegración. En diecisiete de las diecinueve piezas que no se

fracturaron hubo ausencia de borde rodeando a la pieza de Ti, mientras que en las dos restantes (54dP y 56dP) se estableció como “dudoso” por no poder visualizarse con claridad debido a que la calidad de la radiografía no era la óptima. Esto se registró en la tabla 5, la cual se pretendió verificar con métodos más exactos como la microscopía.

Las fotomicrografías permitieron una observación clara de la adaptación de la pieza al tejido circundante. Las observaciones reforzaron las conjeturas tomadas con las placas radiográficas. Las muestras 54dP y 56dP, marcadas como dudosas en la tabla perteneciente a las observaciones por radiografías, fueron evaluadas de tal forma que cedieron a la confirmación de presencia de tejido óseo peri-implantar, en tanto que por lo contrario, en este caso la pieza 60dHA fue quien se catalogó como “dudosa” por visualizarse una interfaz de gran tamaño entre la pieza y la corteza remodelada. En la tabla nº6 se registraron los posibles resultados a ser examinados a través del SEM.

La información obtenida con SEM-EDS permitió determinar la presencia de tejido óseo compacto en los bordes de todas las piezas implantadas. En base a estas imágenes se pudo medir el BIC (contacto implante-hueso) como cuantificación de la oseointegración y la relación Ca/P como calidad del nuevo hueso formado.

Con respecto a la tabla confeccionada luego de la observación mediante lupa estereoscópica, con las imágenes BS-SEM se resolvió la duda sobre la pieza 60dHA, que a 20x parecía estar rodeada de tejido fibroso, pero con este método se comprobó que sólo era un borde más profundo que el resto, constituido por tejido óseo.

Igualmente, mediante este tipo de evaluación se pudo evidenciar el crecimiento óseo en los poros internos de todas las piezas de Ti-P, indicando regeneración ósea en gran medida, y asegurando que la interconectividad de los poros de la pieza ha favorecido el crecimiento interno.

En las tablas nº 10, 11 y 12 del Anexo Nº 9 se exponen los valores porcentuales de BIC medidos para los distintos tipos de muestras, donde se observó que los rangos de valores variaron demasiado, encontrándose los más altos en piezas de Ti poroso y Ti e Hidroxiapatita por ser estos quienes más se adaptaron y oseointegraron.

La composición elemental de las tres fases (pieza, interfaz y hueso), en todos los casos evidencia fuerte presencia de Ca, P y Ti mediante un porcentaje significativo, además de C que pertenece al recubrimiento de la pieza para poder someterse al barrido electrónico y por lo tanto se decidió eliminar de las imágenes presentadas por ser irrelevante (Anexo Nº 8).

El contenido de calcio, fósforo y su relación, obtenidos de los mapeos completos de todas las muestras, se determinó como una forma de evaluar la oseointegración y la calidad de formación del hueso nuevo. El valor de la media de Ca/P más bajo fue de **1,57** correspondiente al Ti-D, seguido del que representa a las de Ti-HA con **1,71** y por último **1,80** del Ti-P. Comparando con la hidroxiapatita de los huesos que posee un ratio Ca/P ideal de 1,67; se concluyó que tanto en los animales que recibieron implantes de Ti-P como Ti-HA, se evidenció formación de nuevo hueso con gran incremento de calcio y fósforo, comprobando la osteoinductividad y osteoconductividad de los biomateriales por encima del Ti denso, logrando gran resistencia en las porosas y bioactividad (unión química) en las que poseían hidroxiapatita.

El análisis estadístico se aplicó sobre los cálculos de BIC tomados para todas las muestras pertenecientes a implantes con distintos tipos de materiales constitutivos. Primero se evaluó de manera generalizada haciendo uso de los estadísticos descriptivos y diagramas de caja, donde se comprobó que en ambos casos los valores más altos de %BIC se encontraron en los grupos de muestras de Ti-P y Ti-HA, pero también se evidenció que en esos casos los valores estuvieron más dispersos que en los grupos de Ti-D.

Seguidamente se ejecutó la prueba ANOVA con el fin de contrastar los resultados de los tres grupos de materiales. Los grupos comparados fueron de distintos "n", siendo nueve muestras de Ti-D, cinco de Ti-P y cuatro de Ti-HA. Mediante el gráfico resultante (Ilustración nº 47) se comprobó que los valores más altos de porcentajes de BIC fueron los de Ti poroso seguidos por los de Ti-HA con medias muy cercanas pero con errores muy grandes, acrecentándose a medida que el número de muestras descendía.

Para poder comparar las muestras "control" con las muestras "problema" del mismo animal (igual "n") se utilizó la Prueba T para muestras apareadas (Ilustraciones nº 48 y 49), donde se debieron tomar dos grupos de Ti denso correspondientes a las patas izquierdas de las muestras de Ti poroso y Ti-HA pertenecientes a las patas derechas del mismo animal. En ambos casos los resultados fueron similares a la prueba ANOVA beneficiando a los implantes de Ti-P.

En las dos pruebas estadísticas se concluyó que las diferencias entre el desempeño de los distintos materiales eran insignificantes. Sin embargo se puede decir que esto se debe a que los "n" para las muestras de Ti-P y Ti-HA eran muy pequeños comparado al número de muestras de Ti-D lo que incrementa el error.

Capítulo 5: Conclusiones

El Proyecto Integrador desarrollado consistió en la sistematización de un modelo experimental para evaluar la biocompatibilidad *in vivo* de piezas de titanio denso, poroso y con hidroxiapatita. Se realizó la implantación en doce ratas con piezas control en los fémures izquierdos y piezas problema en los derechos. Luego de cuatro semanas de experimentación se valoró su desempeño con la aplicación de métodos de análisis de menor a mayor complejidad.

La técnica pulvimetalúrgica permitió la producción de piezas de titanio aptas para su implantación en animales. Se lograron probetas de pequeño diámetro y buen acabado superficial mediante un nuevo diseño de matriz, un nuevo prototipo de soporte de sinterizado y cambios realizados en el ciclo térmico. Esto redujo notablemente el tamaño y el tiempo de producción además de evitar en gran medida la fractura de los fémures.

El análisis microscópico demostró la presencia de tejido óseo en íntimo contacto al material implantado sin provocar alteraciones de ningún tipo, lo que demuestra estabilidad de piezas implantadas y oseointegración. Además con las imágenes SEM se evidenció crecimiento de hueso dentro de poros del Ti-P e integración de la HA bovina con la HA del hueso, ratificando Bioactividad.

Se confirma entonces osteointegración y biocompatibilidad de los implantes quedando un modelo experimental sistematizado, acorde a la Norma ISO 10993 y adecuado para evaluación de diversos biomateriales como reemplazo óseo.

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, sin llegar a la médula ósea.
5. Considerando que la “implantación” como ensayo biológico recomendado por la Norma ISO 10993 no se practica en laboratorios acreditados por la OAA, se propone integrarlo al Laboratorio de biocompatibilidad de la FCEFyN.

Bibliografía y Referencias¹³

1. Amietta J, Boezio L. Diseño e implementación de modelo experimental in vivo para evaluar Ti como material de reemplazo óseo. UNC-FCEFYN; 2015.
2. Mayelín Guerra Bretaña R. Gestión de la calidad de los materiales y dispositivos médicos: requisitos, normativa y regulaciones. Ciudad de La Habana: Editorial Universitaria; 2009.
3. ANMAT. Portal ANMAT. Tramites de registro de productos médicos. [Online]; 2010 [cited 2016 jun 10] Available from: <http://www.anmat.gov.ar/ProductosMedicos/tramites/clasif.asp> (Última visita junio, 2016).
4. Ministerio de Salud, Secretaria de Políticas, Regulación e Institutos, ANMAT. Disposición 4306/99: Requisitos esenciales de seguridad y eficacia de los productos médicos (Resolución GMC MERCOSUR, número 72/98, de 18/08/1999). Disponible en: http://www.hmc.mil.ar/webResources/Documentos/ANMAT_4306.pdf
5. Villegas AM, Naranjo E, Gómez DM. Pruebas de biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico: Revisión de la literatura. Rev. Estomat. 2008; 16 (2): 38-44.
6. International Organization for Standardization, ISO 10993-1: Biological evaluation of medical devices, Part 1: Evaluation and testing in the risk management process; 2009.
7. International Organization for Standardization, ISO 10993-6: Biological evaluation of medical devices, Part 6: Tests for local effects after implantation; 2007.
8. Ministerio de Salud, Secretaria de Políticas, Regulación e Institutos, ANMAT. Disposición N° 2318/02: Reglamento Técnico Mercosur de Re-

¹³ Las referencias bibliográficas se realizaron según Normas de Vancouver Versión 2011, que pueden consultarse en el instructivo de Preparación de PI que se encuentra en http://ingbiomedica.weebly.com/uploads/3/2/2/6/32264937/instructivo_de_preparacion_de_pi-ing.biom-rev1.pdf. Fecha de acceso: 16 de noviembre de 2016.

- gistro de Productos Médicos (Resolución GMC MERCOSUR número 40/00 de 12/07/2002).
9. Ministerio de Salud, Secretaria de Políticas, Regulación e Institutos, ANMAT. Disposición N° 2303/14: Trazabilidad de Productos Médicos (Resolución del Ministerio de Salud, número 2175/2013 de 03/06/2014).
 10. International Organization for Standardization, ISO 7405: Dentistry- Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry (2008).
 11. Ministerio de Salud, Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos, ANMAT. Disposición N° 3266: Reglamento Técnico MERCOSUR de Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Médicos y Productos para Diagnóstico de Uso In Vitro (Resolución GMC Mercosur, numero 20/11 de 03/06/2013).
 12. Navarro Toro ME. Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea. [Tesis Doctoral]. Universidad Politécnica de Catalunya; 2005.
 13. Gutiérrez Gómez J. El proceso de remodelación ósea. Medigraphic 2008; 4 (3): 170-176.
 14. Ikada Y. Challenges in Tissue Engineering. J R Soc. Interface 2006; 3 (10): 589–601.
 15. Estrada C, Paz AC, López LE. Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones básicas. Revista EIA 2006; 5 (5): 93-100.
 16. Barrere F, Mahmood TA, De Groot K, Van Blitterswijk CA. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. Materials Science and Engineering R Reports 2008; 59 (1): 38-71.
 17. Toribio Olea M. Síntesis y caracterización de nanopartículas de fosfato de calcio para la regeneración de tejidos. [Tesis Doctoral]. Universitat Politècnica de Catalunya; 2014.
 18. Regí MV. Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos. AEC [en línea] 2011 [fecha de acceso 25 de abril de 2016]; [12 páginas]. URL disponible:

<http://www.serina.es/empresas/aecientificos/documentos/Biomateriales.pdf>.

19. Oldani C. El camino del titanio como material de reemplazo óseo. Revista FCEFYN 2014; 1 (1): 67-70.
20. Oldani C, Dominguez A. Titanium as a Biomaterial for Implants, Recent Advances in Arthroplasty. InTech [en línea] 2012 [fecha de acceso 5 de mayo de 2016]; DOI: 10.5772/27413. URL disponible en: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-arthroplasty/titanium-as-a-biomaterial-for-implants>.
21. López García M. Estudio experimental en el cerdo del uso de implantes dentales ante situaciones de carga inmediata. [Tesis Doctoral]. Universidad de Santiago de Compostela; 2006.
22. Rugani ML. Evaluación de implantes osteointegrados de superficie microtexturada sometidos a fuerzas ortodóncicas, para ser utilizados en la rehabilitación oral. [Tesis Doctoral]. Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba; 2006.
23. Smalley WM, Shapiro PA, Hohl TH, Kokich VG, Brånemark PI. Osseointegrated titanium implants for maxillofacial protraction in monkeys. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1988; 94 (4): 285-95.
24. Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D, Taylor A, Gottlow J, Nyman S. Bone augmentation at titanium implants using autologous bone grafts and a bioresorbable barrier. An experimental study in the rabbit tibia. Clinical Oral Implants Research 1997; 8 (2): 82-89.
25. Rodil SE. Modificación superficial de biomateriales metálicos. Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales 2009; 29 (2): 67-87.
26. Rodríguez-Rius D, García-Saban F.J. Caracterización físico-química de la superficie de 9 implantes dentales con 3 distintos tratamientos de superficie. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005; 10: 58-65.
27. Aparicio C. Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales. [Tesis Doctoral]. España: Universitat Politècnica de Catalunya; 2005.

28. Martin AJ. Cambios dimensionales que sufren los emergentes maquinados de Titanio al ser personalizados con porcelana para Titanio. [Tesis doctoral]. Facultad de Odontología, UNC; 2012.
29. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg. Suppl* 1977; 16: 1-132.
30. Comín R, Reyna Musso LA, Cid MP, Oldani C, Salvatierra NA. Citotoxicidad de Hidroxiapatita y su morfología en composites con Ti. *LIADE* [online] 2014 [Fecha de acceso 27 de mayo de 2016]; 4 páginas. URL disponible:
<http://www.liade.efn.uncor.edu/informaci%3n.publicaciones/014.pdf>.
31. Passamai Romero VE. Caracterización biológica de piezas de mg y mg con hidroxiapatita. UNC-FCEFyN; 2014.
32. Lax Pérez A, Ortega V, Meseguer L, Alcaraz Baños M, Sepúlveda P, Clavel-Nolla Sanz M, Implante óseo de la espuma de hidroxiapatita-09. Estudio experimental en conejos. *Rev Esp Patol* 2005; 38(1): 14-20.
33. Schwartz-Arad D, Mardinger O, Levin L, Kozlovsky A, Hirshberg A. Marginal bone loss pattern around hydroxyapatite-coated versus commercially pure titanium implants after up to 12 years of follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20(2): 238-244.
34. Yoon SY, Park YM, Park SS, Stevens R, Park HC. Synthesis of hydroxyapatite whiskers by hydrolysis of alpha-tricalcium phosphate using microwave heating. *Materials Chemistry and Physics*. 91(1): 48-53.
35. Oldani C, Gallo M, Canavosio L. Fabricación de un composite poroso de Ti-HA. En Congreso Argentino de Bioingeniería SABI; 2011. Mar del Plata.
36. Gregorio-Vázquez L, Cuevas-Arteaga C, Hernández G, Ángel-Meraz E. Formación de nanoestructuras porosas de TiO₂ mediante la exposición en soluciones de HF-H₂O aplicando la técnica electroquímica de anodización. *Av. Cien Ing* 2013; 4 (1): 85-95.

37. Reig Cerdá L. Desarrollo de piezas porosas de TiAl4V Mediante técnicas Pulvimetalúrgicas. [Tesis Doctoral] Universidad Politécnica de Valencia; 2009.
38. Recio López J M. Obtención y caracterización de titanio poroso para implantes dentales. Escuela Técnica Superior de Ingenieros, Universidad de Sevilla; 2009.
39. Pereyra JM, Valdemarín MD. Obtención de compuestos de titanio con gradiente de porosidad para uso biomédico. UNC-FCEFYN. Departamento de Materiales y Tecnología; 2014.
40. Global Medical Implants sl. Estudio de los materiales de implantación y sus características de compatibilidad biológica aplicando técnicas de microscopía y microanálisis. 2005; 4 p.
41. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials". *Biomaterials* 2000; 21 (7): 667-81.
42. Luchetti CG. Estudio comparativo de injertos de hueso en regeneración ósea guiada. Caracterización de la respuesta frente a injertos autólogos y sustitutos de origen humano, bovino y químico. [Tesis de Maestría]. Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de La Plata; 2004.
43. Xue W, Krishna BV, Bandyopadhyay A, Bose S. Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium. *Acta Biomater.* 2007; 3 (6): 1007-18.
44. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26 (27): 5474-91.
45. Báez AN. Fosfato tetracálcico fraguable, hidroxiapatita sintética y la combinación entre ambos como materiales de injerto en la regeneración ósea. [Tesis de Maestría]. Facultad de Odontología-UNLP; 2013.
46. Faig-Martí J, Gil-Mur FJ. Los recubrimientos de hidroxiapatita en las prótesis articulares. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol* 2008; 52(2): 113-120.
47. Park BS, Heo SJ, Kim CS, Oh JE, Kim JM, Lee G, Park WH, Chung CP, Min BM. Effects of adhesion molecules on the behavior of osteo-

- blast-like cells and normal human fibroblasts on different titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2005; 74 (4): 640-651.
48. Herraiz Lalana E, Bolzoni L, Gordo E. Estudio de aleaciones de Titanio pulvimetalúrgicas con adición de Fe y Cr. Universidad Carlos III de Madrid; 2012.
49. López Padilla R, Oldani C. Obtención de polvos de Hidruro de Titanio. En SAM-CONAMET, Santiago de Chile; 2008.
50. Reis de Vasconcellos LM, Rodarte Carvalho Y, Falchete do Prado R, Oliveira de Vasconcellos LG, De Alencastro Graça M, Alves Cairo CA. Porous Titanium by Powder Metallurgy for Biomedical Application: Characterization, Cell Cytotoxicity and *in vivo* Tests of Osseointegration. *In-Tech* 2012; DOI: 10.5772/47816.
51. International Organization for Standardization, ISO 10993-2: Biological evaluation of medical devices Part 2: Animal welfare requirements; 2006.
52. Conn M. *Animal Models for the Study of Human Disease*. USA: Academic Press; 2013.
53. Nyman R, Magnusson M, Sennerby L, Nyman S, Lundgren D. Membrane-guided bone regeneration. Segmental radius defects studied in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 1995; 66 (2): 169-73.
54. De Almeida M, Lanata-Flores A, Olate S, Pozzer L, Cantín M, Vásquez B, Albergaria-Barbosa J. Torque de Retiro de Implantes de Titanio Instalados en Tibia de Perros con Defecto Óseo. *Int. J. Morphol* 2013; 31 (2): 700-705.
55. Reglamento CICUAL para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Portal FCEFN. [En línea]. 2014 [Fecha de acceso 4 de junio de 2016]. URL disponible en: http://www.efn.uncor.edu/archivos/investigacion/cicual/RHCD_571_2014_Reglamento_CICUAL.pdf.
56. Santís Chamorro IL, Herrera Tuñón KI, Puello del Río EJ. Fracaso en los implantes dentales: Fibrointegración. Reporte de caso clínico. *Rev. Fac. Ciencias de la Salud, Universidad de Magdalena* 2008; 5 (2): 115-120.

57. Vanegas JC, Landinez N, Garzón-Alvarado DA. Generalidades de la interfase hueso-implante dental. *Rev Cubana Invest Bioméd* 2009; 28 (3): 13-146.
58. Arismendi JA, Ospina AM, Agudelo LP. Oseointegración: una cascada de eventos. *Rev Fac. de Odont Univ de Ant* 2000; 12 (1): 27-34.
59. Moreno BM, Herrero Climent M, Calvo PL, Bermejo CM, Sanz Alonso M. Métodos clínicos para valoración de la estabilidad de la interfase implante-hueso. *Periodoncia* 2001; 11 (4): 323-336.
60. Guerra Cobián O, Hernández Pedroso L, Morán López E. Evaluación de la estabilidad de implantes dentales mediante análisis de frecuencia de resonancia. *Rev haban cienc méd* 2015; 14 (4): 46-469.
61. Guerrero Delgado J, Kathan Rodríguez C, Del Río Highsmith J. Protocolo para evaluar la osteointegración. *Gaceta Dental* 2006; (169): 94-109.
62. Tzaphlidou M, Speller R, Royle G, Griffiths J, Olivo A, Pani S, Longo R. High resolution Ca/P maps of bone architecture in 3D synchrotron radiation microtomographic images. *Elsevier* 2005; 62 (4): 569-575.
63. Sotiropoulou P, Fountos G, Martini N, Koukou V, Michail C, Kandarakis I, Nikiforidis G. "Bone calcium/phosphorus ratio determination using dual energy X-ray method". *Phys Med.* 2015; 31 (3): 307-13.
64. Tzaphlidou M, Fountos G, Glaros D. Bone Hydroxyapatite/Collagen Ratio In Vivo Measurements by X-ray Absorptiometry. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 904: 284-286.
65. Bornancini CA. Cicatrización post-apicectomía: contribución a su estudio (Control Radiográfico e histológico. Cuantificación de la reparación en relación con el proceso tratado). [Tesis Doctoral]. Facultad de Odontología-UNC; 1991.
66. Vera Martinez N. Densidad mineral ósea en ratas de la cepa Wistar mediante un método de Rayos X. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales; 2011.

67. Unidad de Cirugía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela. Evaluación Biológica de un Implante Dental; 2009.
68. Nistal AM. Microscopía Láser Confocal. Servicio de Proceso de Imágenes. Universidad de Oviedo; 2014.
69. Fontana S. Respuesta biológica de los rellenos óseos. Estudio experimental. [Tesis Doctoral]. Facultad de Odontología- UNC; 2009.
70. PropDental. Osteointegración. [En línea]. 2014 [Fecha de acceso 8 de julio de 2016]. URL disponible en: <https://www.propdental.es/implantes-dentales/osteointegracion/>.
71. Guercio E, Dinatale E. Consideraciones estructurales y biológicas en la oseointegración. Revisión de la literatura. Acta odontol. venez 2009; 47 (1): 1-7.
72. Sobak G, Weiss A, Gotman I. Osseointegration of Ti6Al4V alloy implants coated with titanium nitride by a new method. J Bone Joint Surg 2000; 82: 290-296.
73. Berillis P, Emfietzoglou D, Tzaphlidou M. Collagen Fibril Diameter in Relation to Bone Site and to Calcium/Phosphorus Ratio. The Scientific World Journal 2006; 6: 1109-1113.
74. Shah FAA, Nilson B, Branemark R, Thomsen P, Palmquist A. The bone-implant interface – nanoscale analysis of clinically retrieved dental implants. Nanomedicine: NBM 2014; 10: 1729-1737.
75. Hazañas Ruiz S, Méndez Perez LI, Solano García A, Mora Huzman MJ. Estudio histomorfométrico del hueso diafisario en la rata. Rev Esp Cir Osteoart 1993; 28: 315-321.
76. Mourelle AC, Herrero E, Ricca. Recomendación para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio. Spei Domus- Universidad Cooperativa de Colombia 2013; 9 (19): 39-47.
77. Ministerio de Salud de la Nación. Guía de procedimientos y métodos de esterilización y desinfección para establecimientos de salud. Argentina,

Resolución 387/2004; URL disponible en:
http://www.msal.gob.ar/pngcam/resoluciones/msres387_2004.pdf.

78. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Congreso de Bienestar Animal. InfoVet 2010; 113: 24 p.
79. De Los Santos Hernández R, Toquero Elizalde LA, Urban Cruz LA. Normatividad en el uso de animales. [En línea] 2014 [Fecha de acceso 2 de julio de 2016]. URL disponible en: <http://bioetica-fez.wikispaces.com/Anexos>.
80. Aramburú GJ, Aguzzi AC, Ricco VE, Hubert SA, Aguilar J, Königheim B, Virga CM. Efecto sobre el tejido óseo de la aplicación subcutánea de una nueva formulación en base a Alendronato. Efecto sobre tejido óseo del Alendronato. Acta odontol. venez 2008; 46 (4): 1-9.
81. Cantarini, LM. Estudio descriptivo de la capacidad de adaptación de una resina compuesta en cavidades clase I in vitro preparadas con instrumental de alta rotación y con láser de Er-YAG en primeros molares y premolares permanentes. [Tesis doctoral]. Facultad de Odontología-UNC; 2014.
82. Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X. Portal LAMARX. [En línea]. 2008 [Fecha de acceso 7 de junio de 2016]. URL disponible en: <http://lamarx.famaf.unc.edu.ar/>.
83. Gorustovich A, Rosenbusch M, Guglielmotti MB. Characterization of Bone Around Titanium Implants and Bioactive Glass Particles: An Experimental Study in Rats. Int J Oral Maxillofac Implants 2002; 17 (5): 644-50.
84. Doria C, De Santis V, Falcone G, Proietti L, De Santis E. Osseointegration in hip prostheses: experimental study in sheep. International Orthopaedics (SICOT) 2003; 27: 272–277.
85. Gil FJ, Ginebra MP, Planell JA. Metales y aleaciones para la sustitución de tejidos duros. Biomecánica 1999; 7 (13): 73-78.
86. Valenzuela C, Carrasco JM, Yáñez S. Estudio clínico piloto: cuñas de titanio, una alternativa para mejorar la estabilidad primaria de implantes. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabíl. Oral 2010; 3(1): 39-42.

87. Park MY, Kim YJ, Choi SM, Oh SH, Kim YJ, Taik W, An LJ, Choi SY. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Using Ammonium Hydroxide and Ethylenediaminetetraacetic Acid. *View issue TOC 2015*; 36 (7): 1806-1811.
88. Takeshita F, Iyama S, Ayukawa Y, Akedo H, Suetsugu T. *Biomaterials*. Study of bone formation around dense hydroxyapatite implants using light microscopy, image processing and confocal laser scanning microscopy 1997; 18 (4): 317-22.
89. Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Suzuki J, Kokubo T, Nakamura T. Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials* 2005; 26 (30): 6014-23.

Anexos

ANEXO N° 1: Ensayos de biocompatibilidad según Norma ISO 10993

	Muestra de ensayo						Muestra de control					
Número del animal:												
Inflamación polimorfonuclear												
Linfocitos												
Células plasmáticas												
Macrófagos												
Células gigantes												
Necrosis												
SUB-TOTAL (x2)												
Neovascularización												
Fibrosis												
Infiltrado adiposo												
SUB-TOTAL												
TOTAL												
TOTAL DEL GRUPO												
PROMEDIO	ENSAYO (-) CONTROL =											
Necrosis traumática												
Detritus extraños												
N° de sitios examinados	El perímetro del implante.											

Tabla 8: Modelo de evaluación histológica según ISO 10993-6¹⁴

¹⁴ Modelo adaptado de Unidad de Cirugía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela. Evaluación biológica de un implante dental; 2009.

Categorización de dispositivos médicos:			Efecto Biológico								
Naturaleza del contacto		Duración del contacto ¹⁵	Citotoxicidad	Sensibilización	Irritación o reactividad intercutánea	Toxicidad sistémica	Toxicidad subcrónica	Genotoxicidad	Implantación	Hemocompatibilidad	
Categoría	Contacto										
Dispositivo de superficie		A	X	X	X						
		B	X	X	X						
		C	X	X	X						
	Membrana mucosa	A	X	X	X						
		B	X	X	X						
		C	X	X	X		X	X			
	Superficie violada o comprometida	A	X	X	X						
		B	X	X	X						
		C	X	X	X		X	X			
Dispositivo de comunicación externa	Vía de sangre – Indirecta	A	X	X	X	X				X	
		B	X	X	X	X				X	
		C	X	X			X	X	X	X	
	Tejido- hueso-dentina	A	X	X	X						
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	
	Sangre circulante	A	X	X	X	X					X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Dispositivo implantable	Tejido- hueso	A	X	X	X						
		B	X	X	X	X	X	X	X		
		C	X	X	X	X	X	X	X		
	Sangre	A	X	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	

Tabla 9: Elección de ensayos de biocompatibilidad según naturaleza y tiempo del contacto (ISO 10993-1)

¹⁵ A-limitado:<24 hs. B-prolongado:>24 hs a 30 días. C-permanente:>30 días.

Anexo Nº 2: Planos de fabricación e Imágenes de matriz de Acero

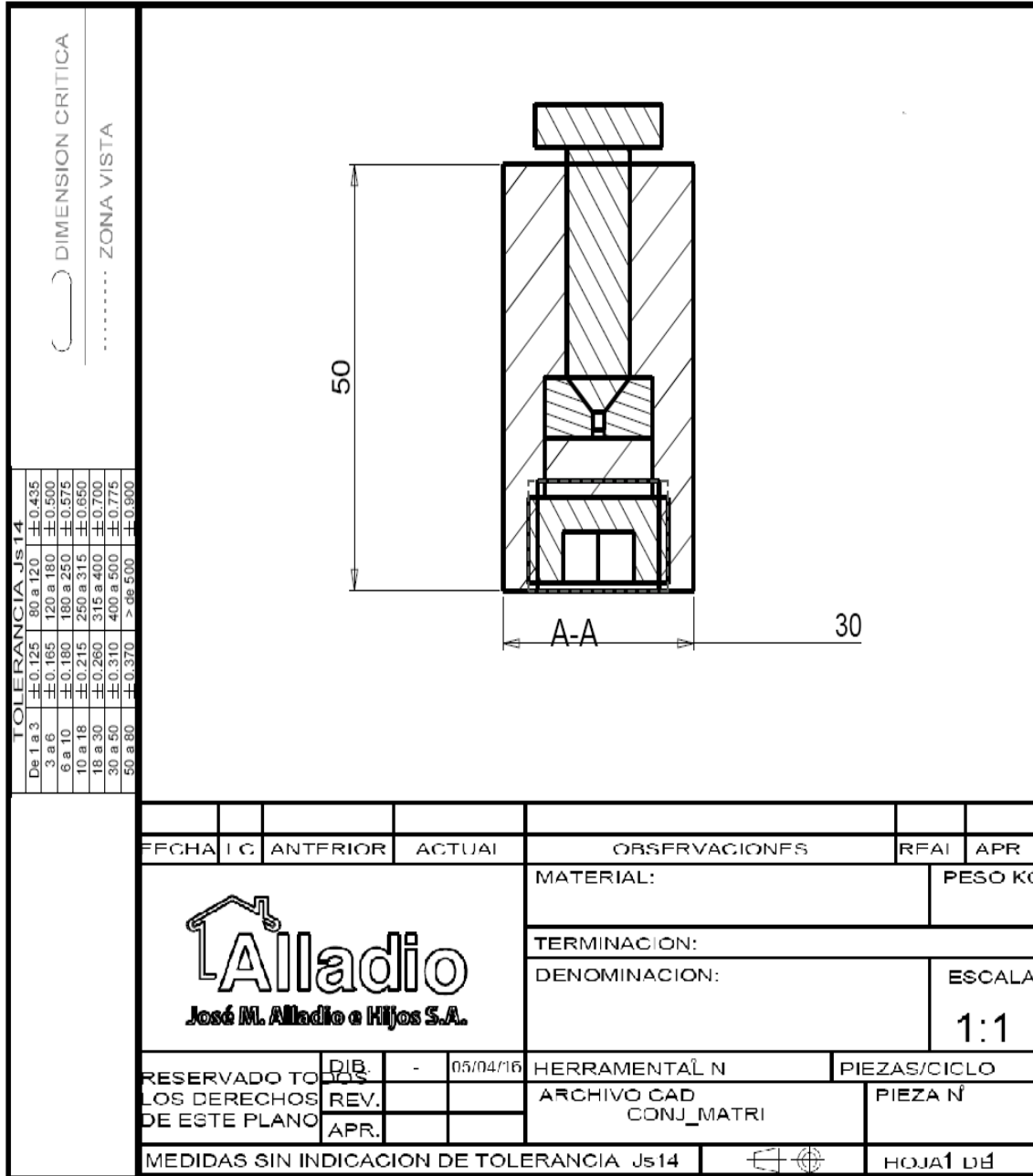


Ilustración 50: Plano "Conjunto Matriz"

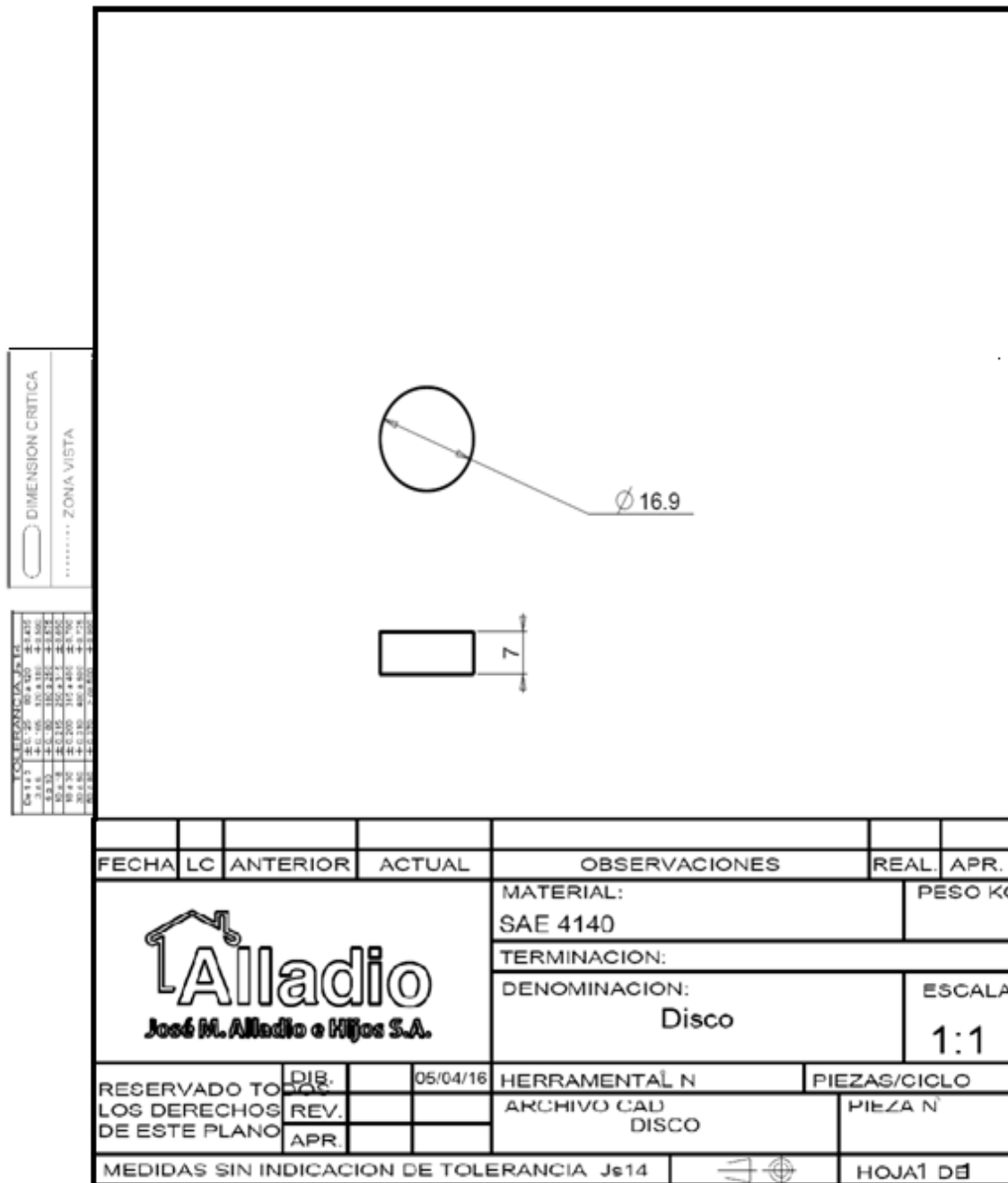
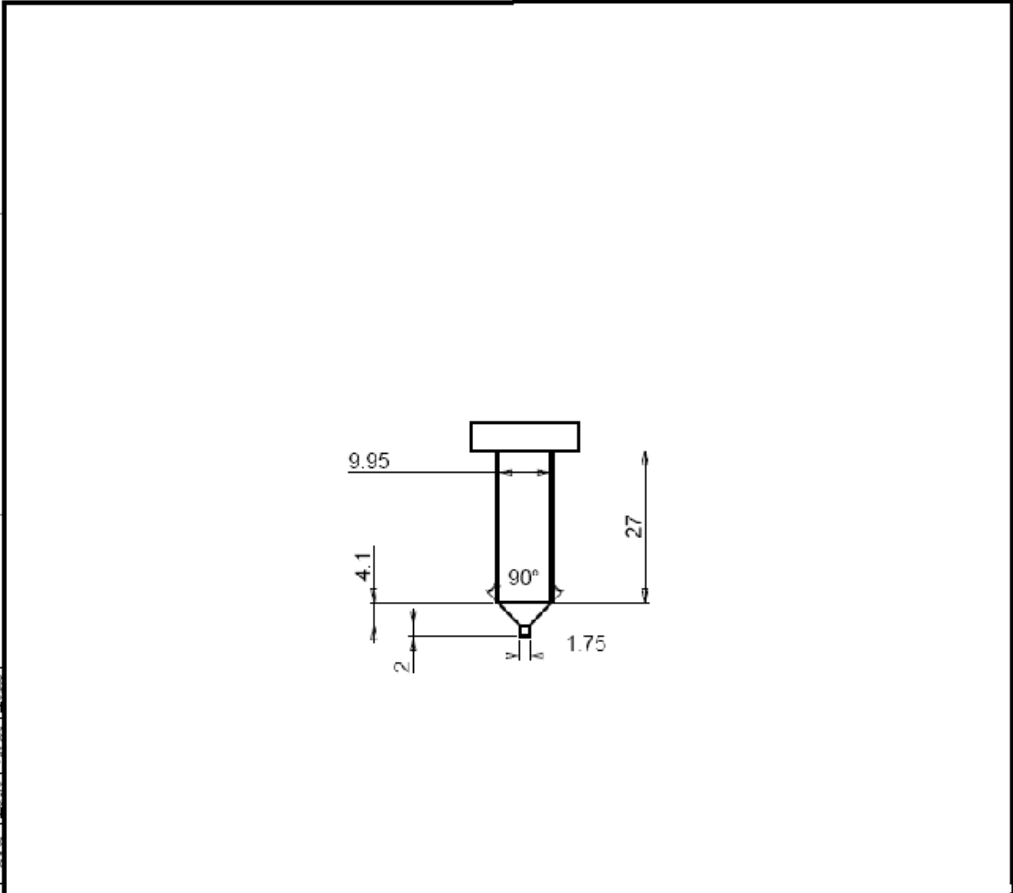


Ilustración 51: Plano "Disco"

DIMENSION CRITICA	
ZONA VISTA	
TOLERANCIA JS14	
D.14.3	+0.050
S.14	+0.040
S.15	+0.030
S.16	+0.020
S.17	+0.010
S.18	+0.000
S.19	-0.010
S.20	-0.020
S.21	-0.030
S.22	-0.040
S.23	-0.050
S.24	-0.060
S.25	-0.070
S.26	-0.080
S.27	-0.090
S.28	-0.100
S.29	-0.110
S.30	-0.120
S.31	-0.130
S.32	-0.140
S.33	-0.150
S.34	-0.160
S.35	-0.170
S.36	-0.180
S.37	-0.190
S.38	-0.200
S.39	-0.210
S.40	-0.220
S.41	-0.230
S.42	-0.240
S.43	-0.250
S.44	-0.260
S.45	-0.270
S.46	-0.280
S.47	-0.290
S.48	-0.300
S.49	-0.310
S.50	-0.320
S.51	-0.330
S.52	-0.340
S.53	-0.350
S.54	-0.360
S.55	-0.370
S.56	-0.380
S.57	-0.390
S.58	-0.400
S.59	-0.410
S.60	-0.420
S.61	-0.430
S.62	-0.440
S.63	-0.450
S.64	-0.460
S.65	-0.470
S.66	-0.480
S.67	-0.490
S.68	-0.500
S.69	-0.510
S.70	-0.520
S.71	-0.530
S.72	-0.540
S.73	-0.550
S.74	-0.560
S.75	-0.570
S.76	-0.580
S.77	-0.590
S.78	-0.600
S.79	-0.610
S.80	-0.620
S.81	-0.630
S.82	-0.640
S.83	-0.650
S.84	-0.660
S.85	-0.670
S.86	-0.680
S.87	-0.690
S.88	-0.700
S.89	-0.710
S.90	-0.720
S.91	-0.730
S.92	-0.740
S.93	-0.750
S.94	-0.760
S.95	-0.770
S.96	-0.780
S.97	-0.790
S.98	-0.800
S.99	-0.810
S.100	-0.820
S.101	-0.830
S.102	-0.840
S.103	-0.850
S.104	-0.860
S.105	-0.870
S.106	-0.880
S.107	-0.890
S.108	-0.900
S.109	-0.910
S.110	-0.920
S.111	-0.930
S.112	-0.940
S.113	-0.950
S.114	-0.960
S.115	-0.970
S.116	-0.980
S.117	-0.990
S.118	-1.000



FECHA	LC	ANTERIOR	ACTUAL	OBSERVACIONES	REAL	APR.
				MATERIAL:	PESO KG	
				SAE 4140		
RESERVADO TODOS LOS DERECHOS DE ESTE PLANO				TERMINACION:	ESCALA	
				DENOMINACION Vástago		
DISEÑADO	REV.	APR.	05/04/16	HERRAMENTAL N	PIEZAS/CICLO	
				ARCHIVO CAD VASTAGO	PIEZA N°	
MEDIDAS SIN INDICACION DE TOLERANCIA JS14						HOJA 1 DE 1

Ilustración 53: Plano "Vástago"

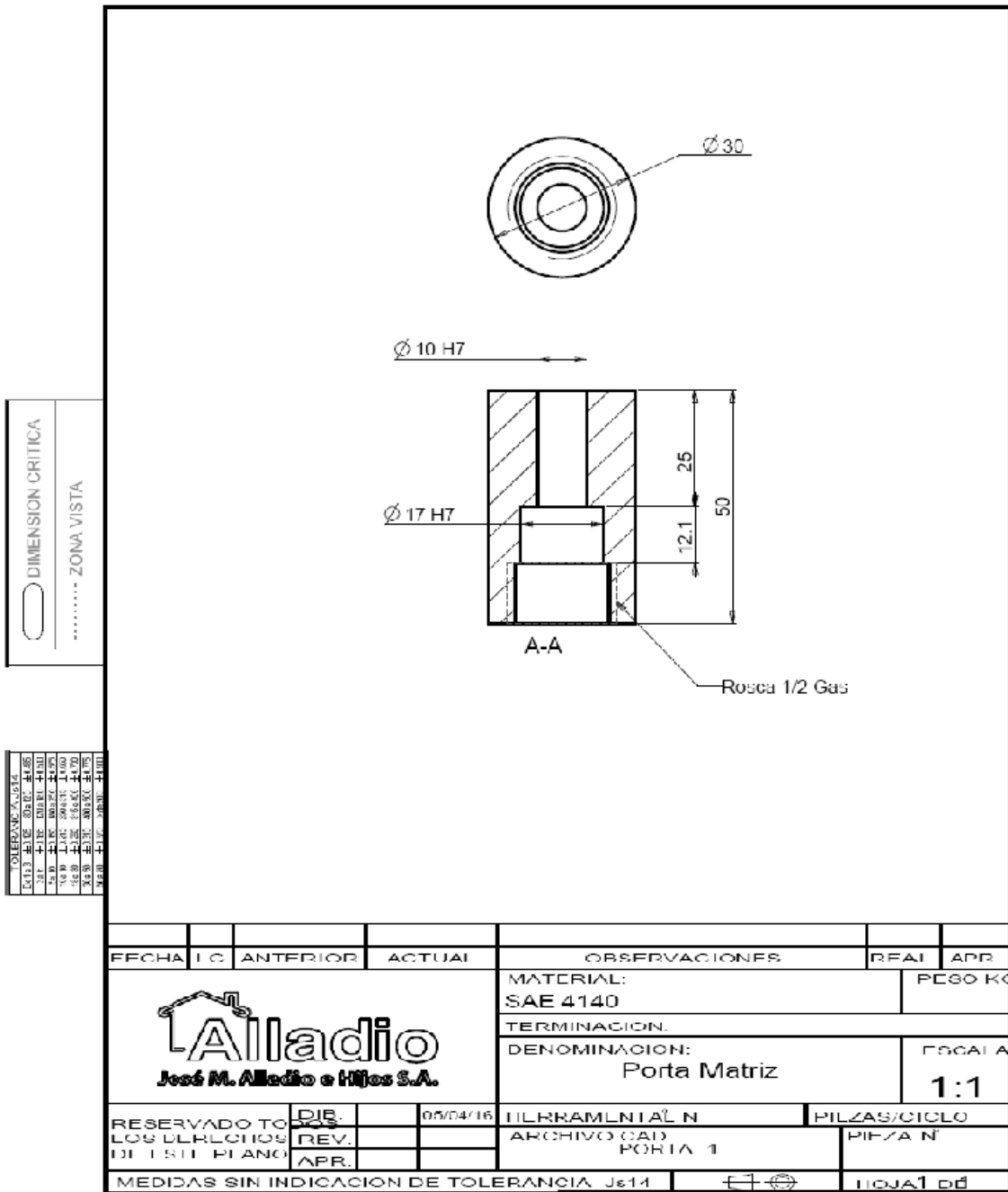


Ilustración 54: Plano "Porta"



Ilustración 55: Cilindro base



Ilustración 56: Cilindro base en vista inferior



Ilustración 57: Punzón

Anexo N° 3: Fabricación de pieza “en verde”



Ilustración 58: Llenado de la matriz con polvo



Ilustración 59: Ayuda manual para el desmolde



Ilustración 60: Desmolde de la pieza en verde

Anexo Nº 4: Mediciones sobre pruebas piloto

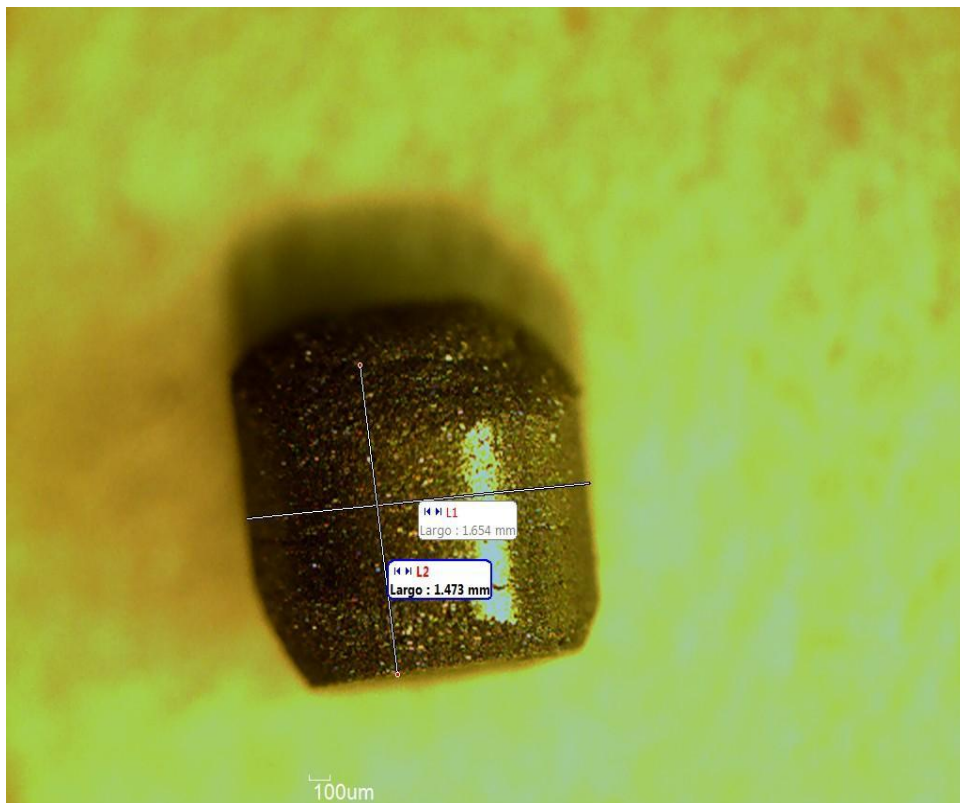


Ilustración 61: pieza de 1,6 mm de diámetro y 1,4 mm de alto

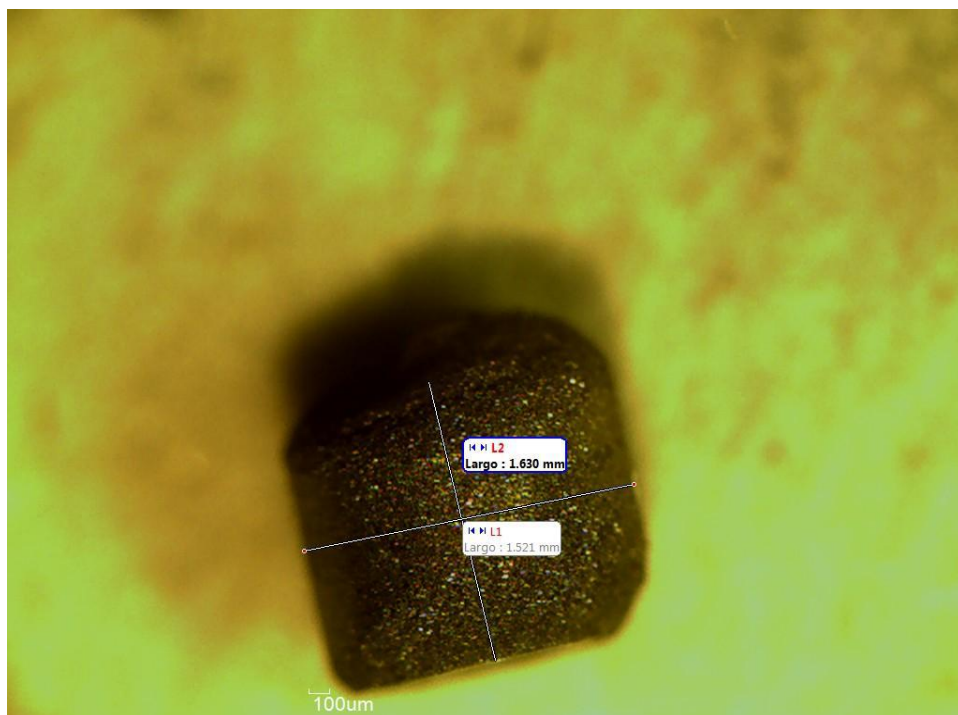


Ilustración 62: Pieza de 1,6 mm de diámetro y 1,5 mm de alto

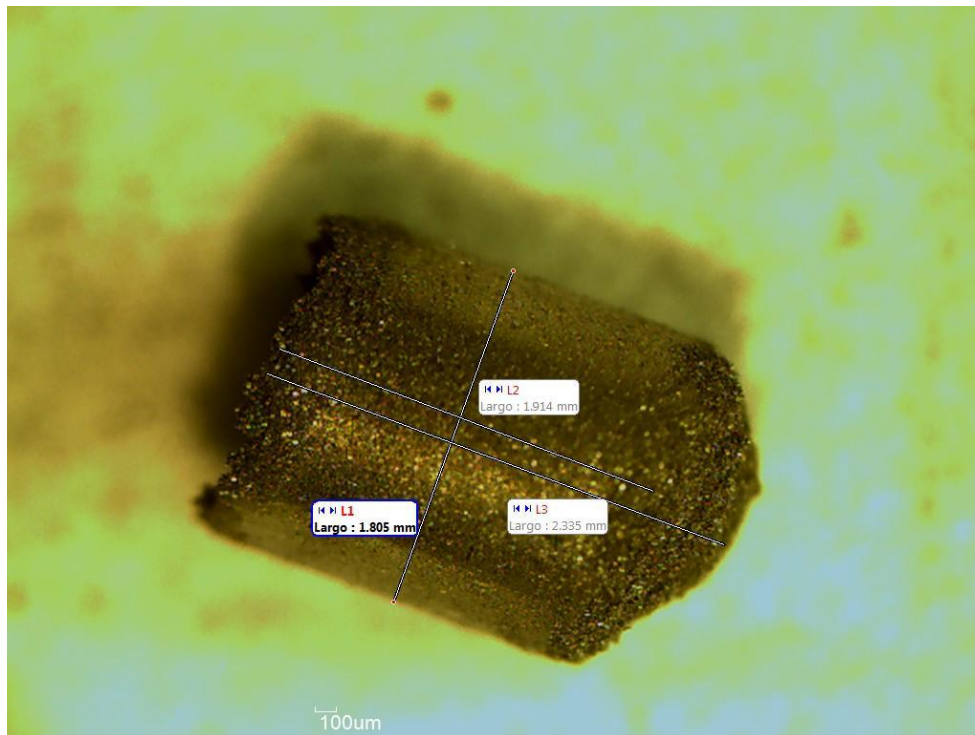


Ilustración 63: Pieza de 1,9 mm de diámetro y 1,8 mm de alto

Anexo N° 5: Procedimiento quirúrgico¹⁶

1. Preparación del elementos quirúrgicos necesarios: sumergir instrumental en alcohol, preparar agujas de sutura con el Nylon, separar algodón en pequeños trozos y colocarlo junto a recipiente con solución fisiológica (Vea Ilustración n° 63).
2. Acondicionar una sala chica adyacente al área de cirugía a 28 °C para recuperación de los animales.
3. Aclimatación: Traslado de los animales a ser operados, desde el bio-terio a la sala de cirugía como mínimo 30 minutos antes.
4. Pesaje y registración de la rata.
5. Cálculo de la anestesia según el peso (Hidrato de Cloral, 420 mg/kg)
6. Inyección de anestesia de manera intraperitoneal.
7. Aproximadamente tres minutos después, verificación de ausencia de reflejo palpebral y respuesta motora a estímulo doloroso.
8. Depilación de la zona a trabajar. Puede efectuarse con una maquinita de afeitar convencional o una hoja tipo gillette.
9. Verificación nuevamente de ausencia de reflejos, en caso de haberlos recuperado escasamente se refuerza la anestesia con Éter.
10. Por palpación se identifica el fémur, y el largo del mismo, a partir de distinguir las articulaciones fémoro-tibial y coxo-femoral.
11. Incisiones: Se realizan por planos, primero la piel y luego el músculo. La incisión de piel se hace con instrumental quirúrgico adecuado y de forma paralela al eje longitudinal del fémur.
12. Identificación del septo intermuscular (línea blanca) que separa los músculos bíceps femoral (hacia anterior) y glúteo mayor (hacia posterior).
13. Incisión en la línea blanca para separar los dos paquetes musculares, evitando la destrucción tisular y rotura de vasos. Se debe descartar el uso de bisturí.
14. Acceso a la cara anterior del fémur.
15. Remoción del periostio con la hoja de corte. Despeje del tejido muscular con tijeras de Backhaus.
16. Trepanación del hueso utilizando torno odontológico con fresa esférica de 1,5 mm de diámetro, en la mitad distal de la diáfisis femoral, en la cara visible. El orificio debe atravesar completa la capa de hueso cortical, llegando a la médula. Al mismo tiempo se debe sostener la apertura de los músculos evitando contacto con el torno (Vea Ilustración n° 64).
17. Limpieza del área ósea con algodón y solución fisiológica.

¹⁶ Adaptación de Amietta J, Boezio L. Diseño e Implementación de modelo experimental in vivo para Evaluar Ti como material de reemplazo óseo. FCEFyN-UNC; 2015.

18. Colocación de pieza tratando de no generar presión sobre el defecto realizado (Vea ilustración nº 65). Registro de tipo de pieza implantado en cada ocasión (Ti poroso y Ti-HA de forma alternada en fémur derecho y Ti denso en izquierdo).
19. Repetición del proceso para la extremidad contralateral.
20. Sutura con material no absorbible de origen sintético (Nylon), de forma interrumpida (o discontinua) realizando puntos simples equidistantes, tanto en plano muscular y dérmico.
21. Marcaje de la rata, según método explicado.
22. Inyección de ibuprofeno para analgesia (0,1 ml) de forma intraperitoneal.
23. Traslado a caja limpia y cercano a artefacto generador de calor manteniendo un ambiente de 28°C (Vea Ilustración nº 66).
24. Monitoreo postoperatorio día de por medio durante cuatro semanas seguidas.

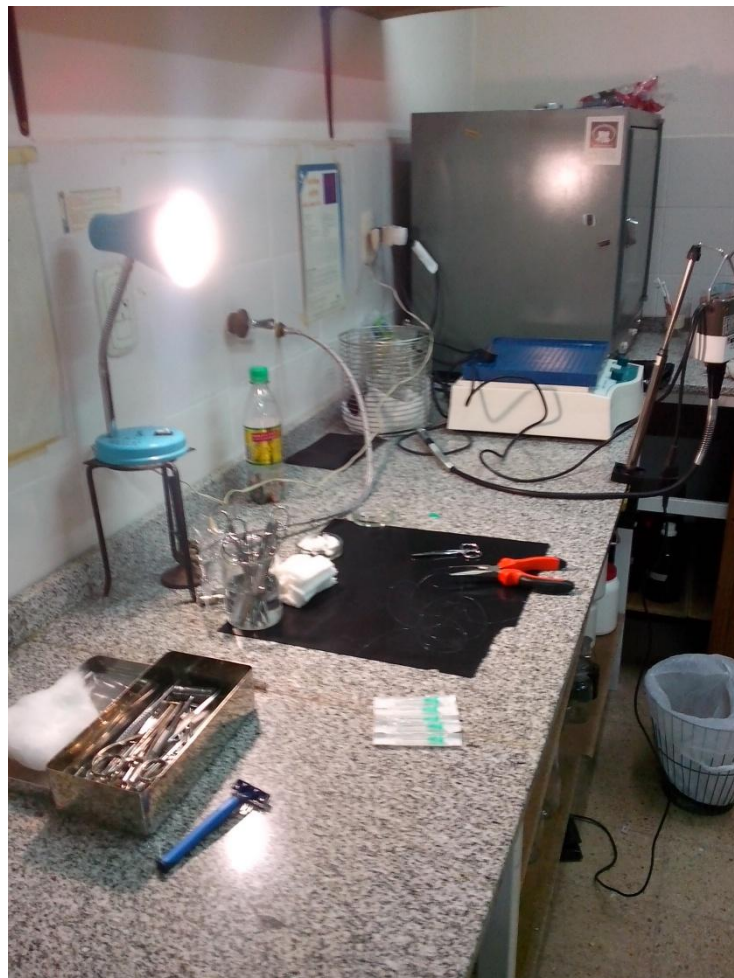


Ilustración 64: Preparado de elementos necesarios para la cirugía



Ilustración 65: Trepanación del fémur



Ilustración 66: Colocación de pieza en el orificio realizado, sin ejercer presión.



Ilustración 67: Post-operatorio en ambiente climatizado

Anexo N° 6: placas radiográficas



Ilustración 68: 4 IZQUIERDA (Ti)



Ilustración 69: 4 DERECHA (Ti-P)



Ilustración 70: 5 IZQUIERDA (Ti)



Ilustración 71: 5 DERECHA (Ti-HA)



Ilustración 72: 6 IZQUIERDA (Ti)



Ilustración 73: 40 IZQUIERDA (Ti)



Ilustración 74: 40 DERECHA (Ti-HA)



Ilustración 75: 44 IZQUIERDA (2Ti)



Ilustración 76: 44 DERECHA (Ti-P)



Ilustración 77: 45 IZQUIERDA (2Ti)



Ilustración 78: 45 DERECHA (Ti-HA)



Ilustración 79: 46 IZQUIERDA (Ti)



Ilustración 80: 46 DERECHA (Ti-P)



Ilustración 81: 50 IZQUIERDA (Ti)



Ilustración 82: 50 DERECHA (Ti-HA)



Ilustración 83: 54 IZQUIERDA (Ti)



Ilustración 84: 54 DERECHA (Ti-P)



Ilustración 85: 55 IZQUIERDA (Ti)



Ilustración 86: 55 DERECHA (Ti-HA)



Ilustración 87: 56 IZQUIERDA (Ti)



Ilustración 88: 56 DERECHA (2 Ti-P)



Ilustración 89: 60 IZQUIERDA (2 Ti)



Ilustración 90: 60 DERECHA (Ti-HA)

Anexo N° 7: Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

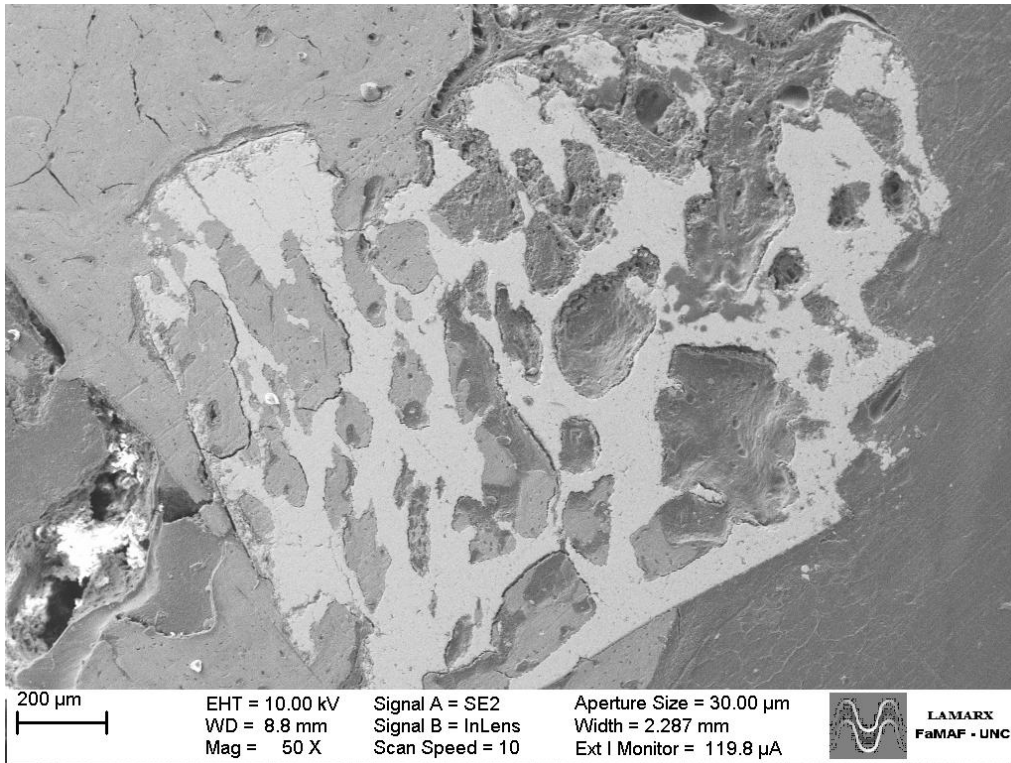


Ilustración 91: SEM - Muestra 4dP (50X)

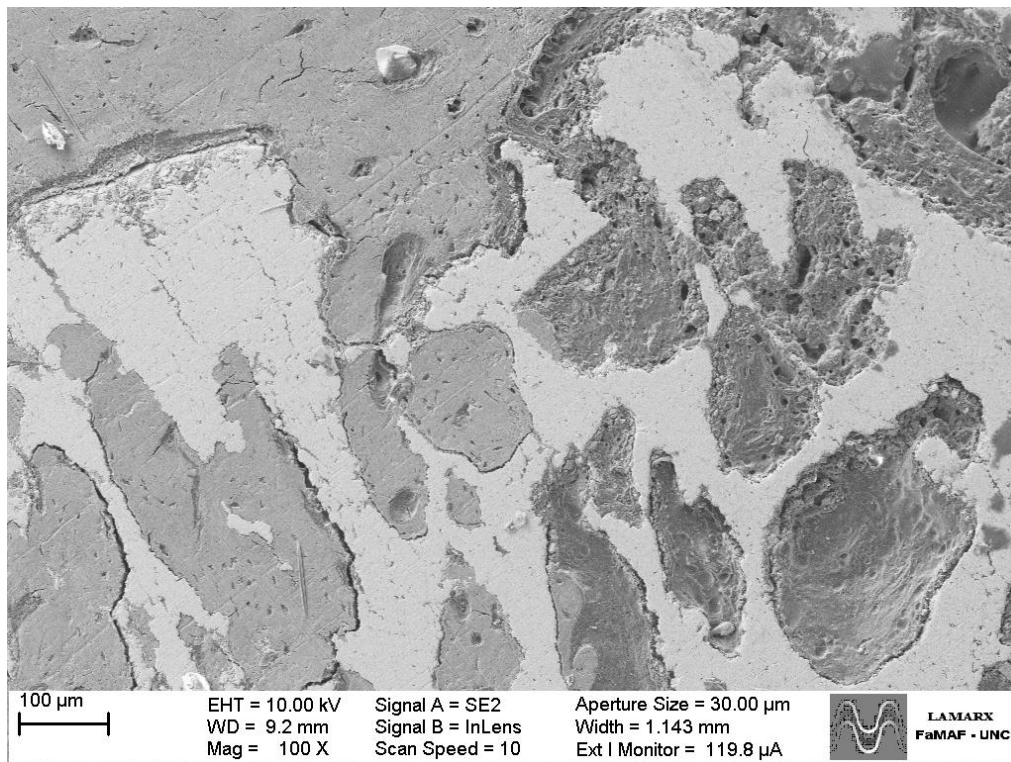


Ilustración 92: SEM - Muestra 4dP (100X)

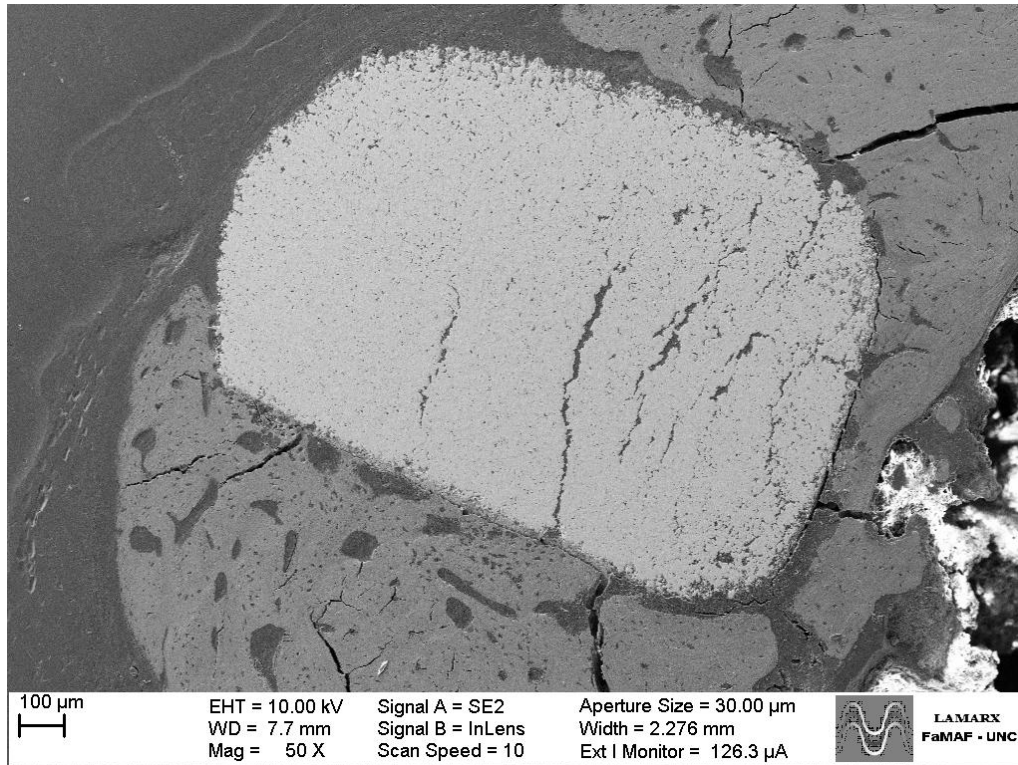


Ilustración 93: SEM - Muestra 5iD (50X)

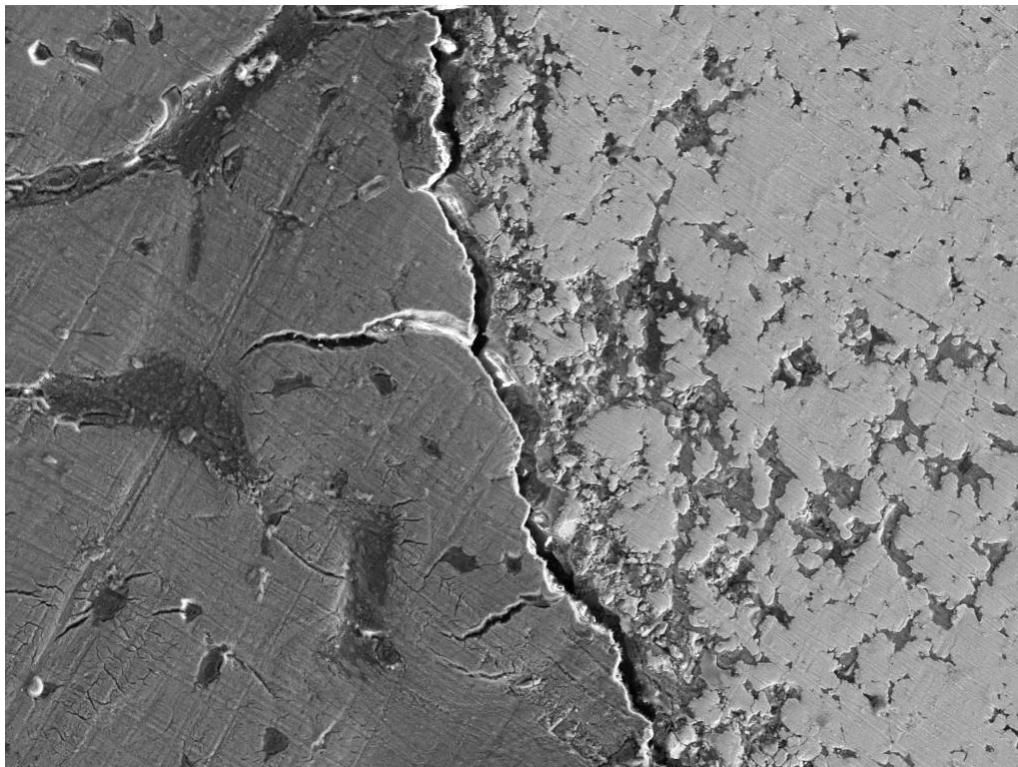


Ilustración 94: SEM - Muestra 5iD (391X)

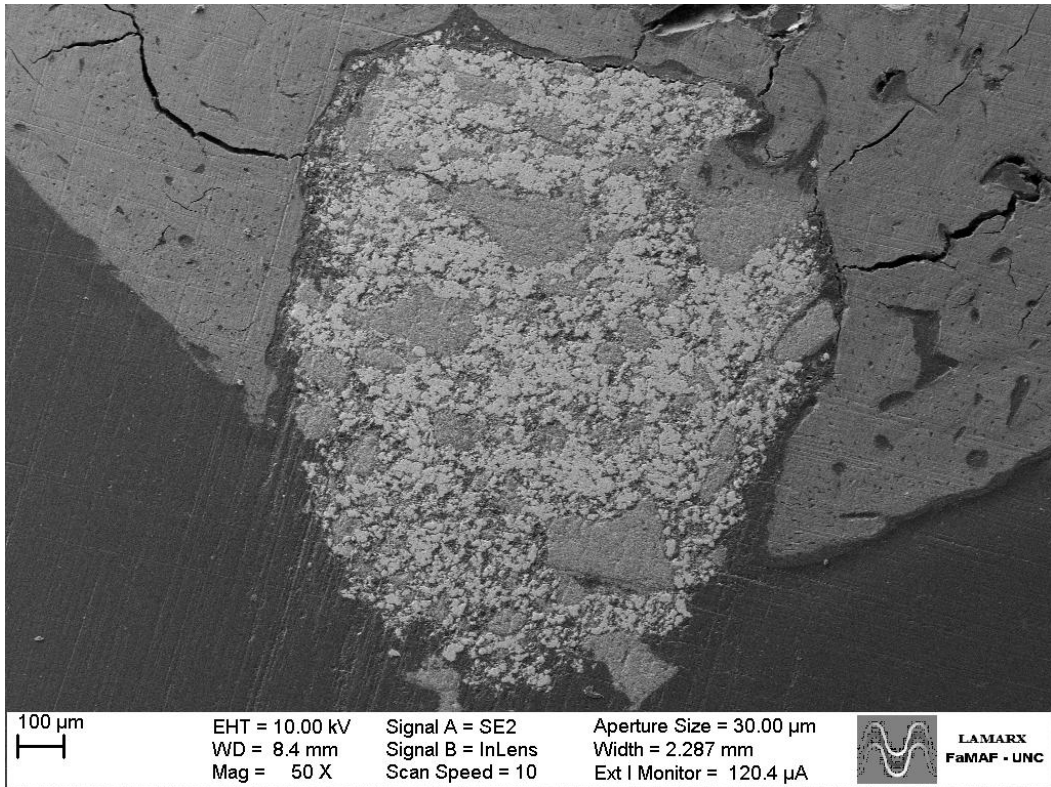


Ilustración 95: SEM - Muestra 5dHA (50X)

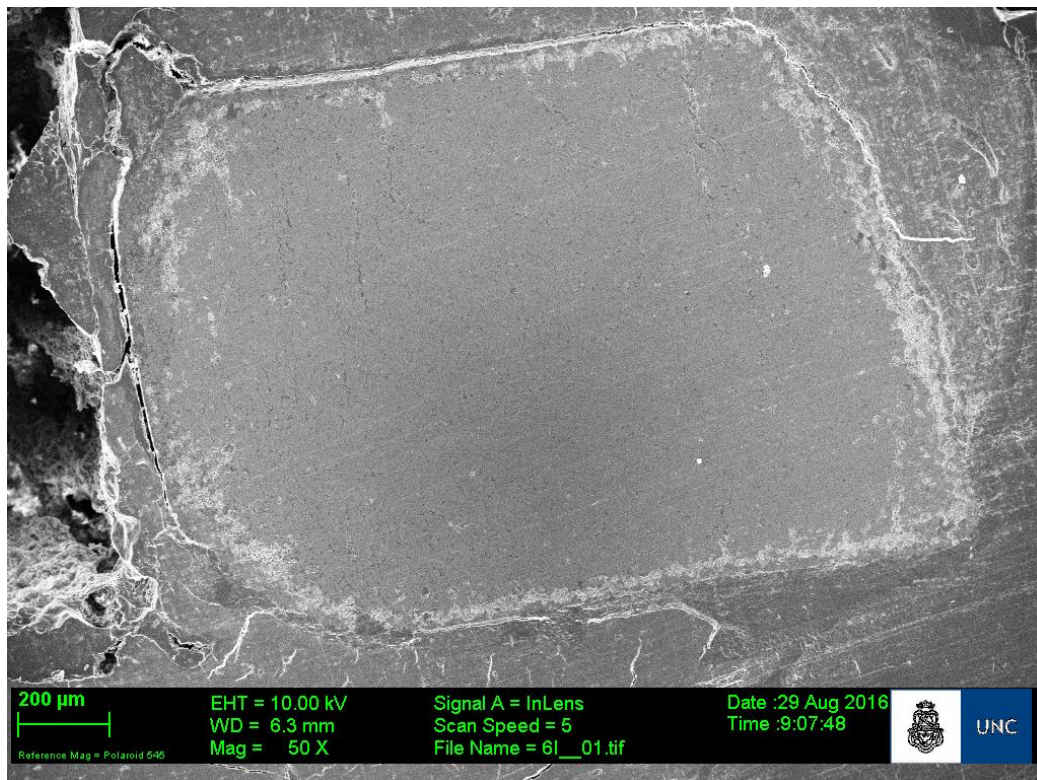


Ilustración 96: SEM - Muestra 6iD (50X)

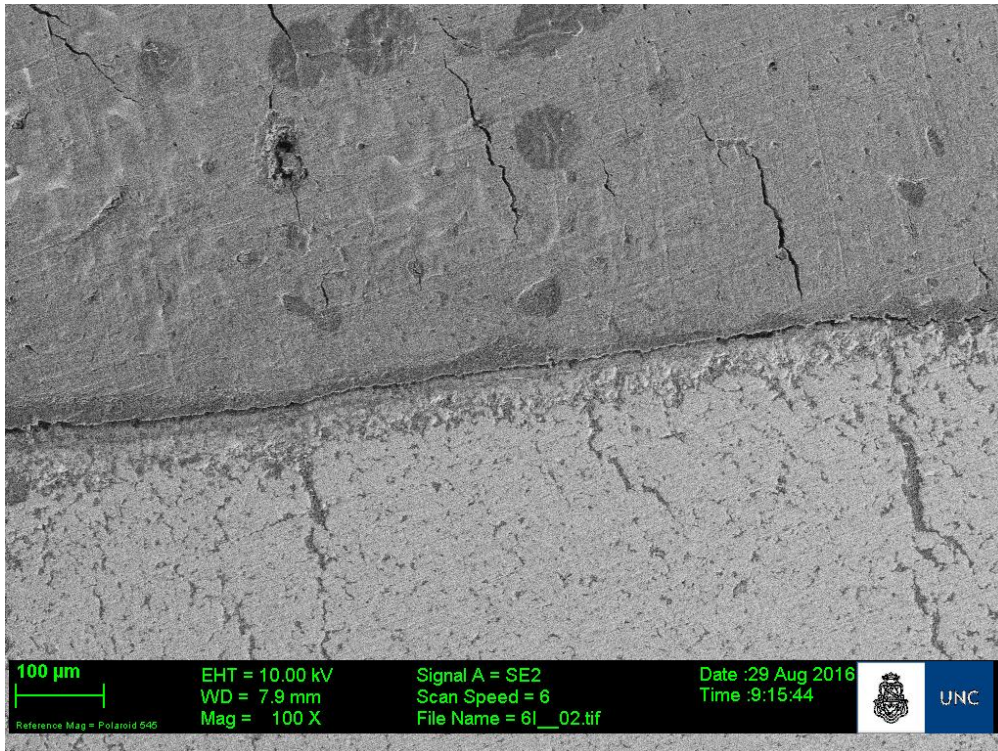


Ilustración 97: SEM - Muestra 6iD (100X)

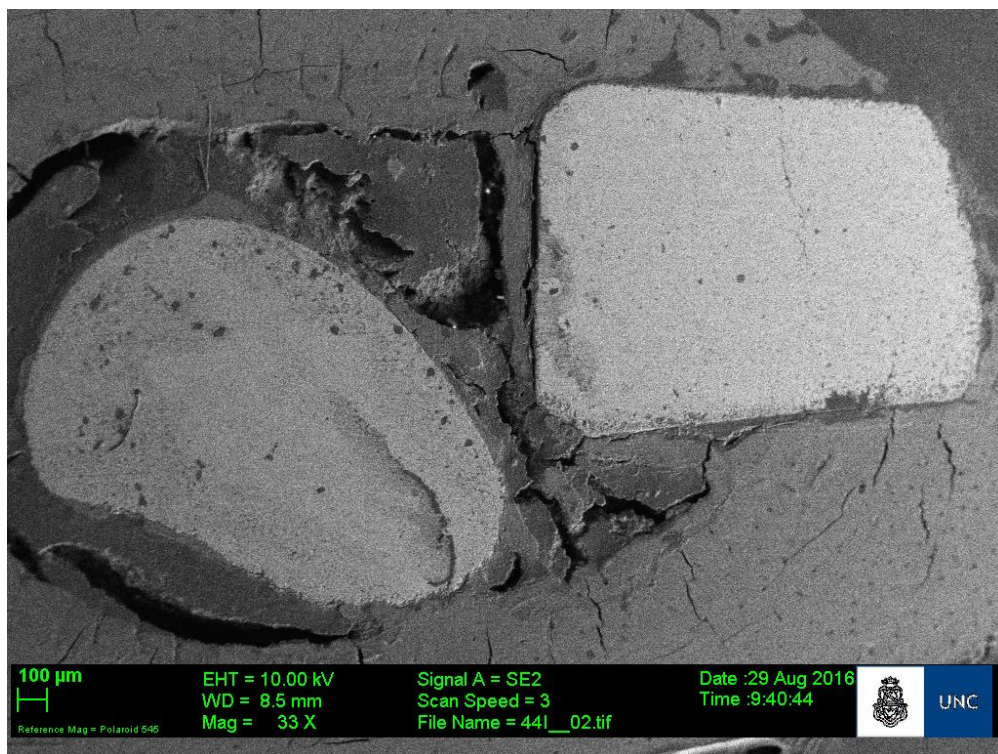


Ilustración 98: SEM - Muestra 44iD (33X)

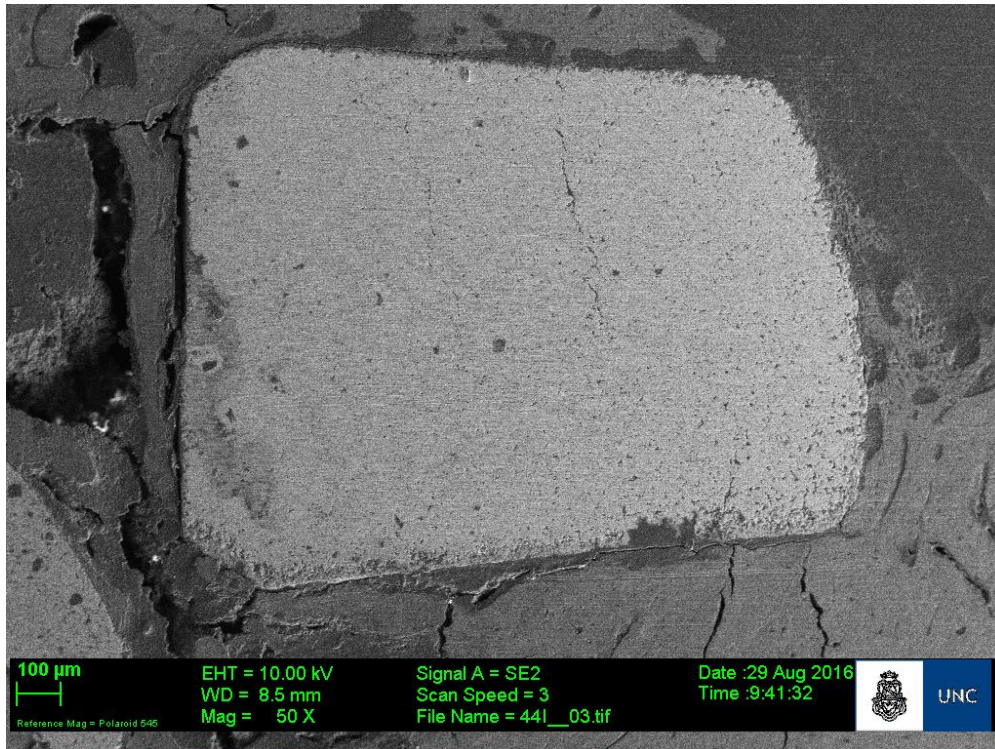


Ilustración 99: SEM - Muestra 44iD (50X)

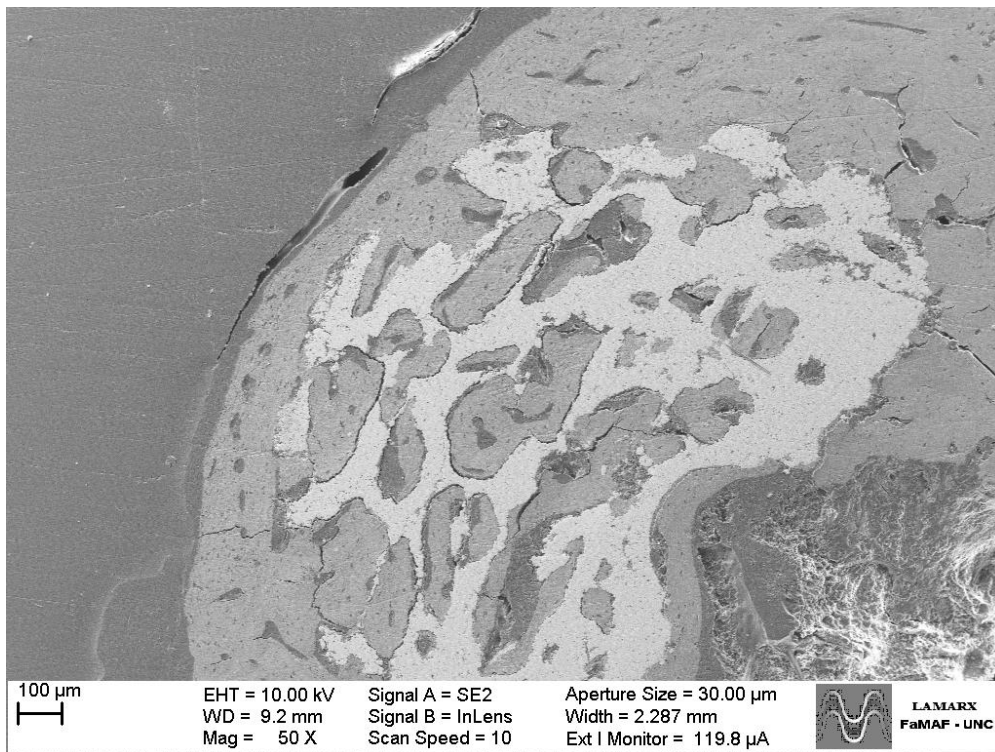


Ilustración 100: SEM - Muestra 44dP (50X)

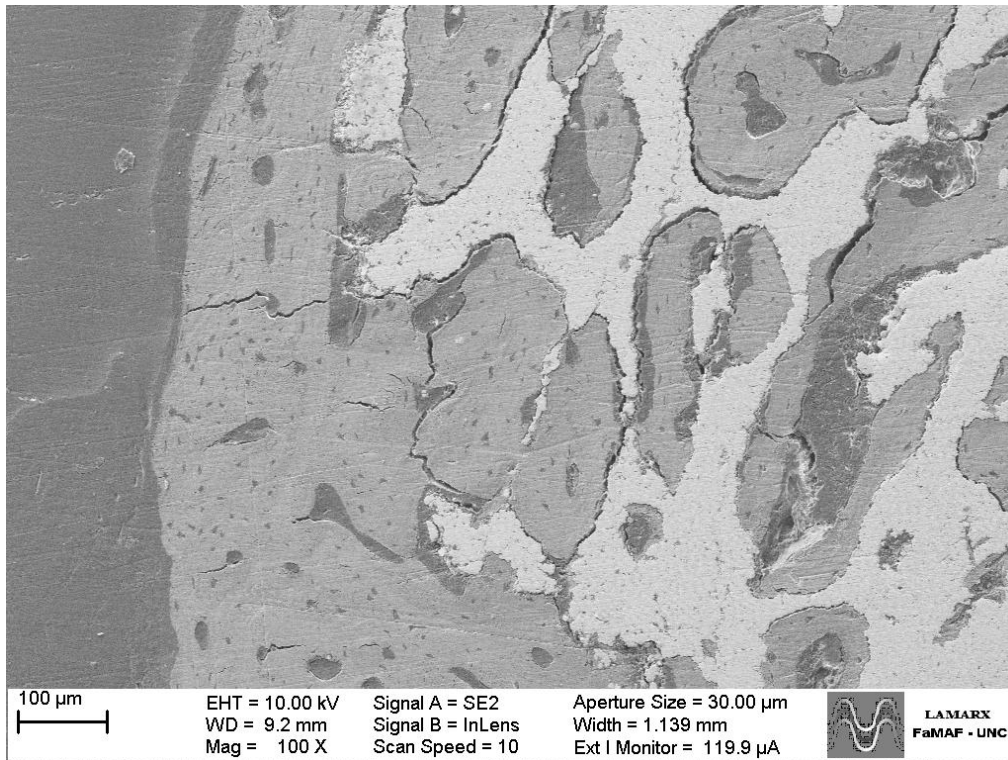


Ilustración 101: SEM - Muestra 44dP (100X)

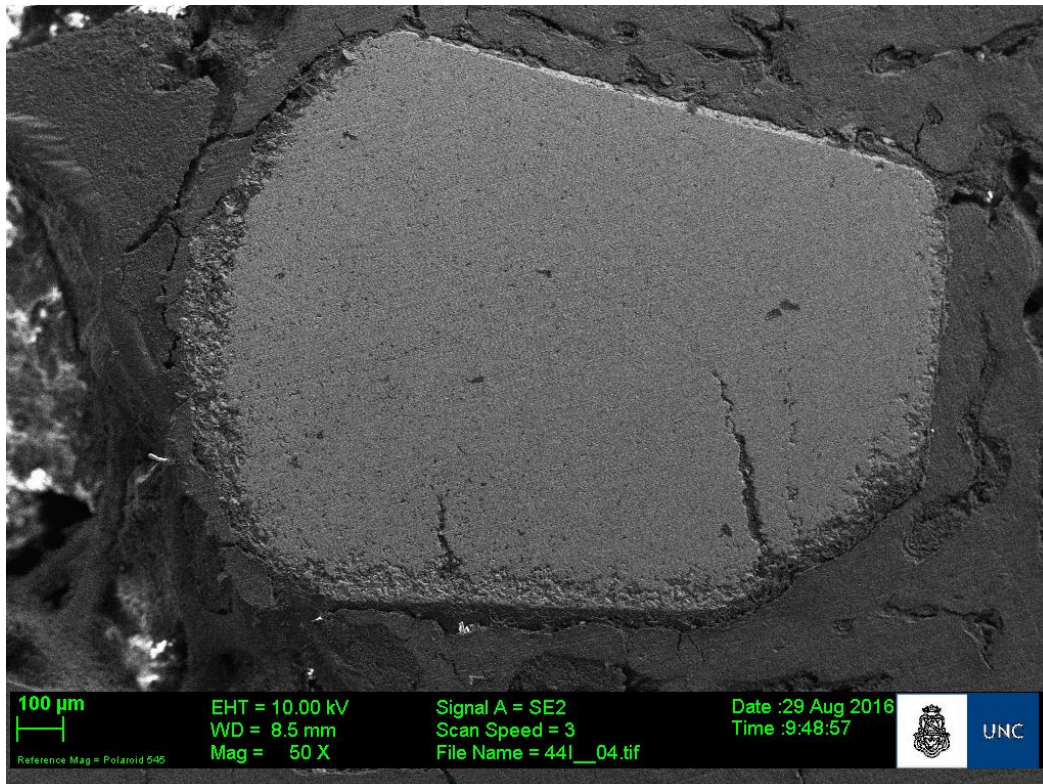


Ilustración 102: SEM - Muestra 45iD (50X)

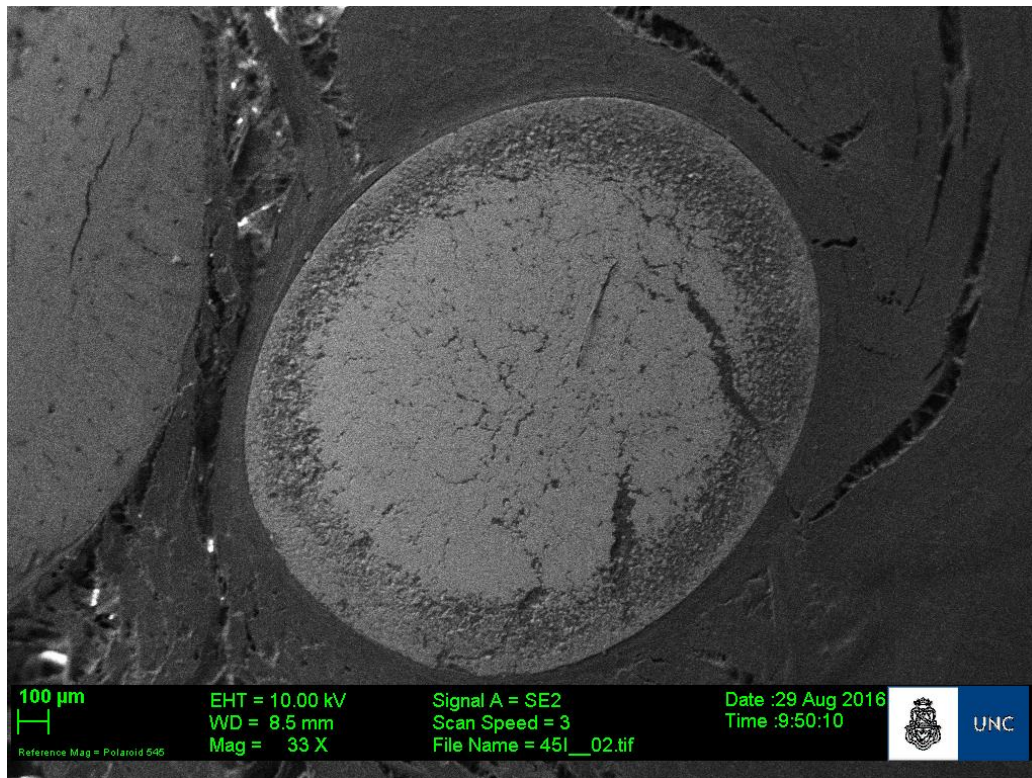


Ilustración 103: SEM - Muestra 45iD (33X)

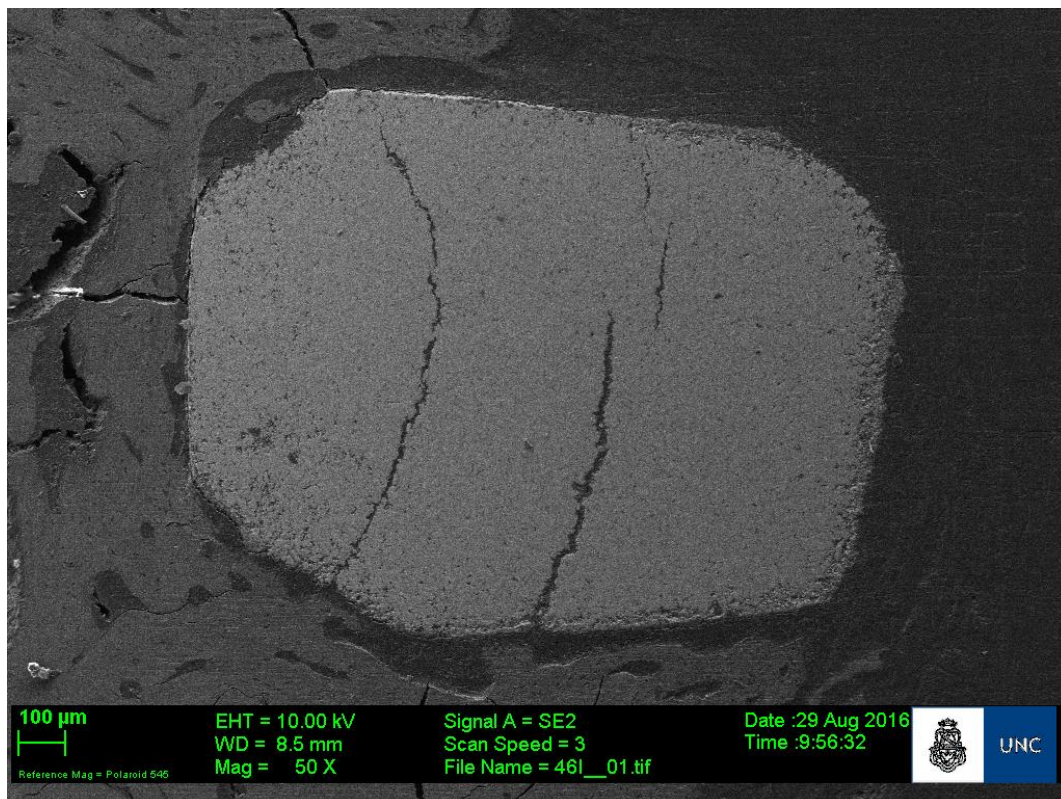


Ilustración 104: SEM - Muestra 46iD (50X)

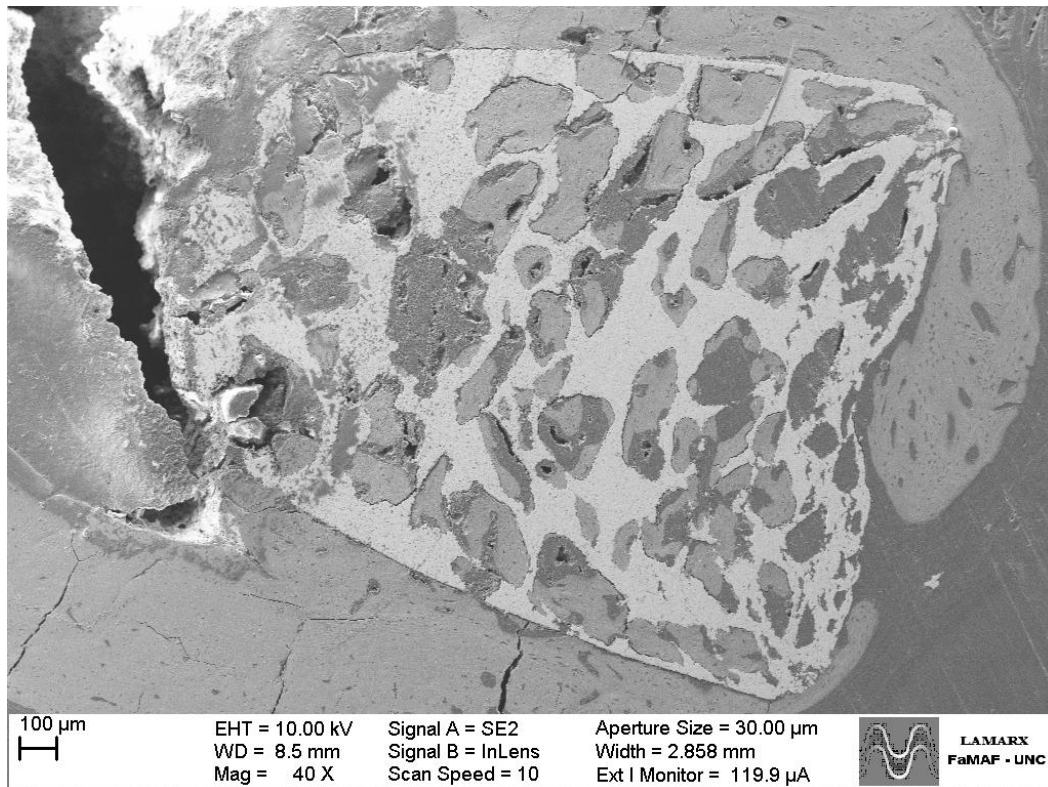


Ilustración 105: SEM - Muestra 46dP (40X)

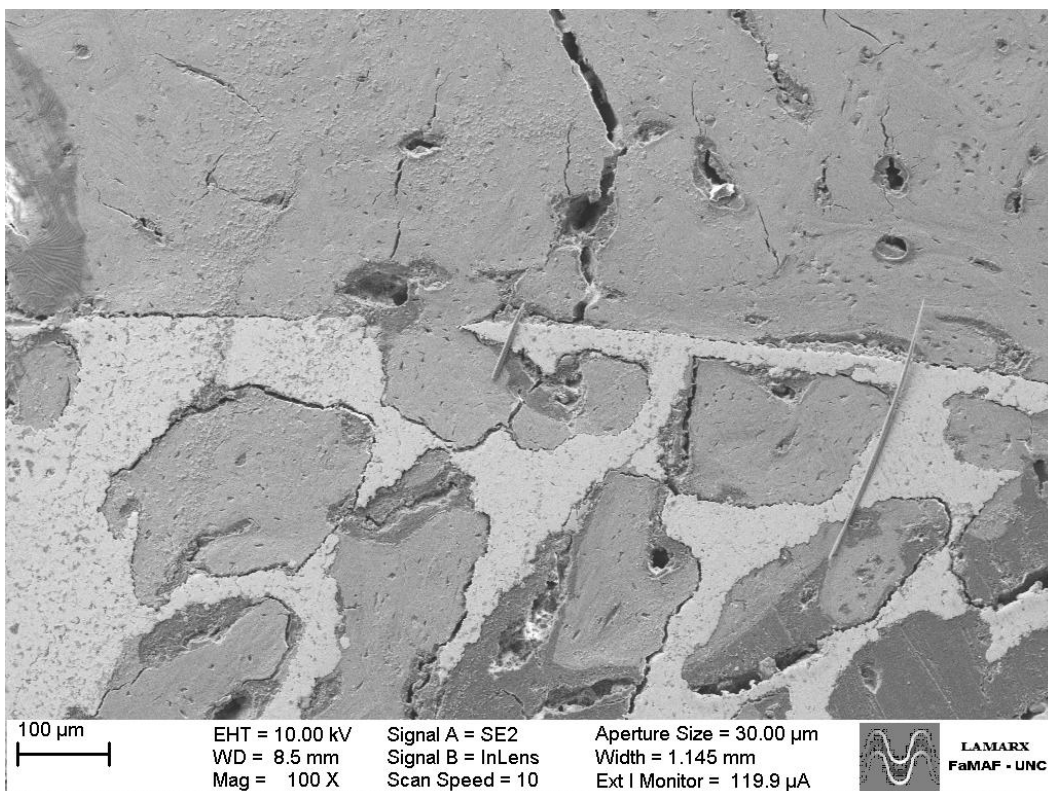


Ilustración 106: SEM - Muestra 46dP (100X)

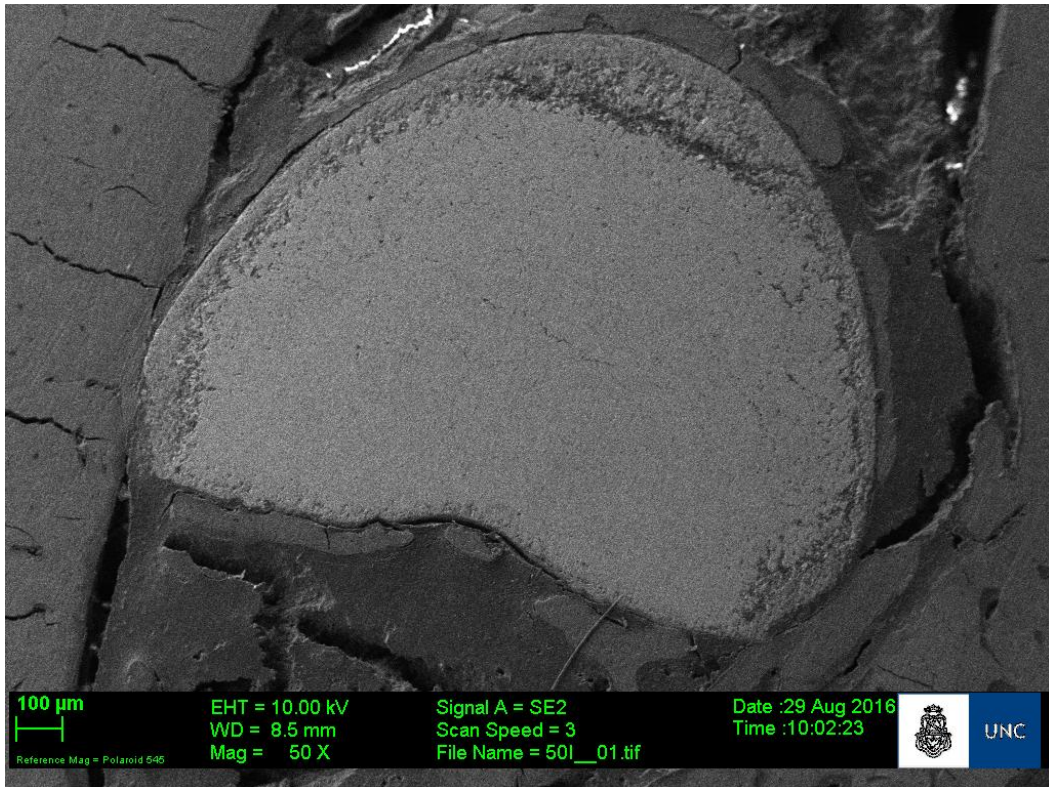


Ilustración 107: SEM - Muestra 50iD (50X)

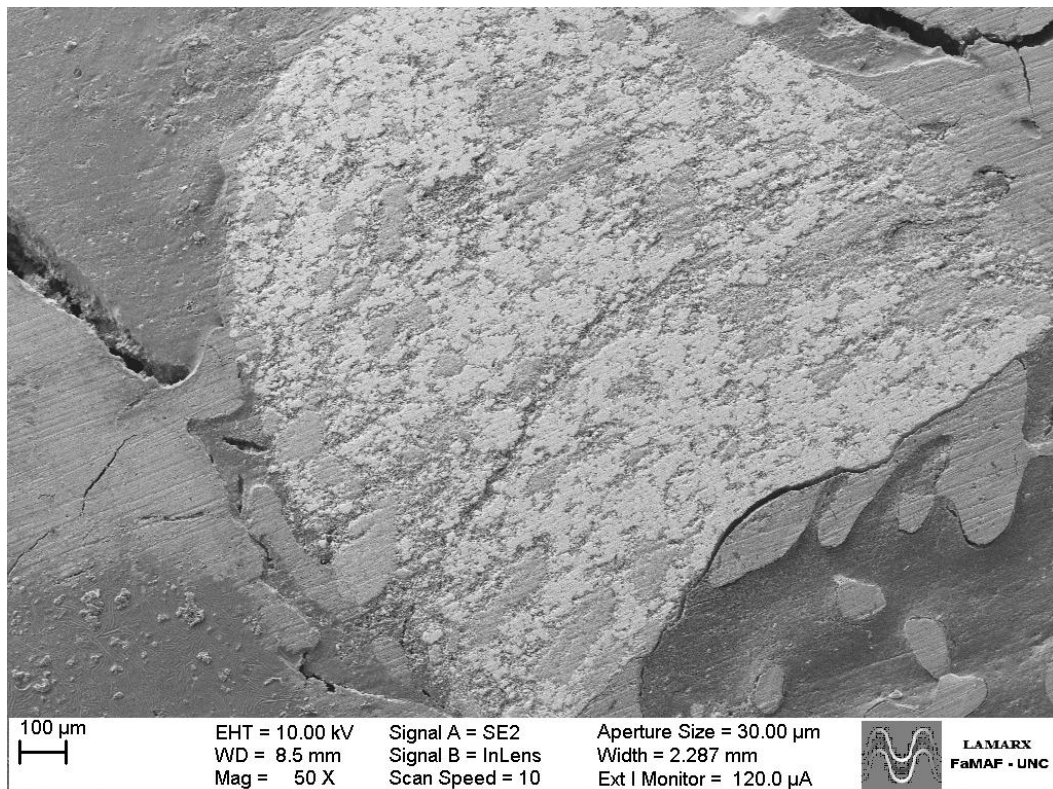


Ilustración 108: SEM - Muestra 50dHA (50X)

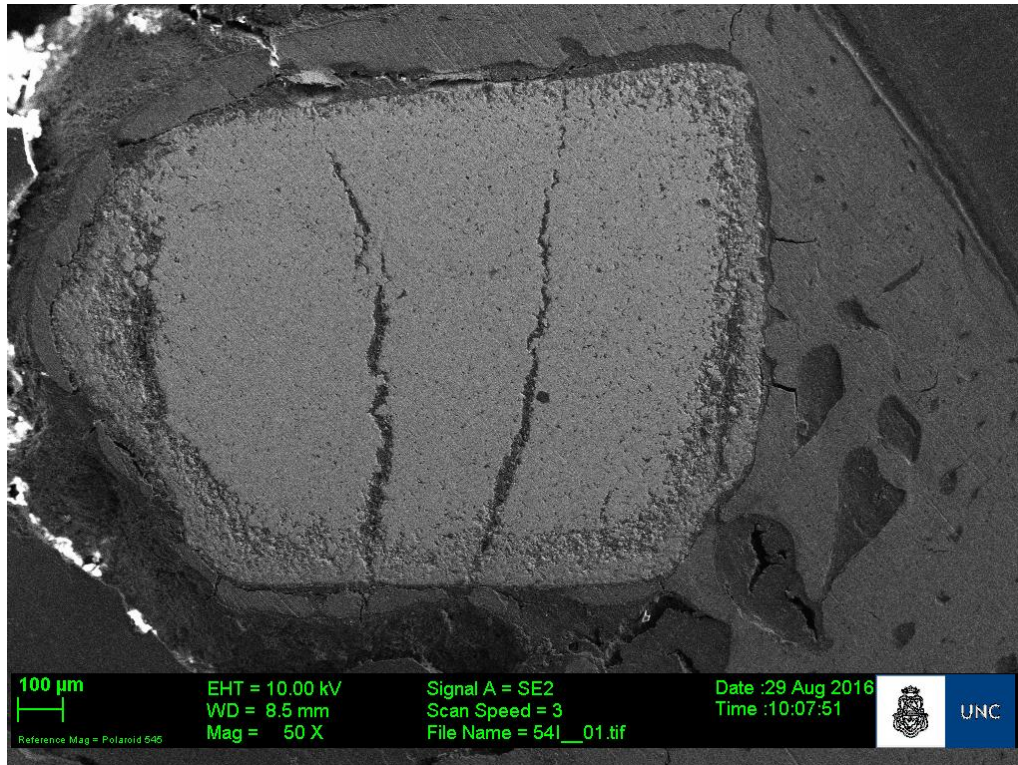


Ilustración 109: SEM - Muestra 54iD (50X)

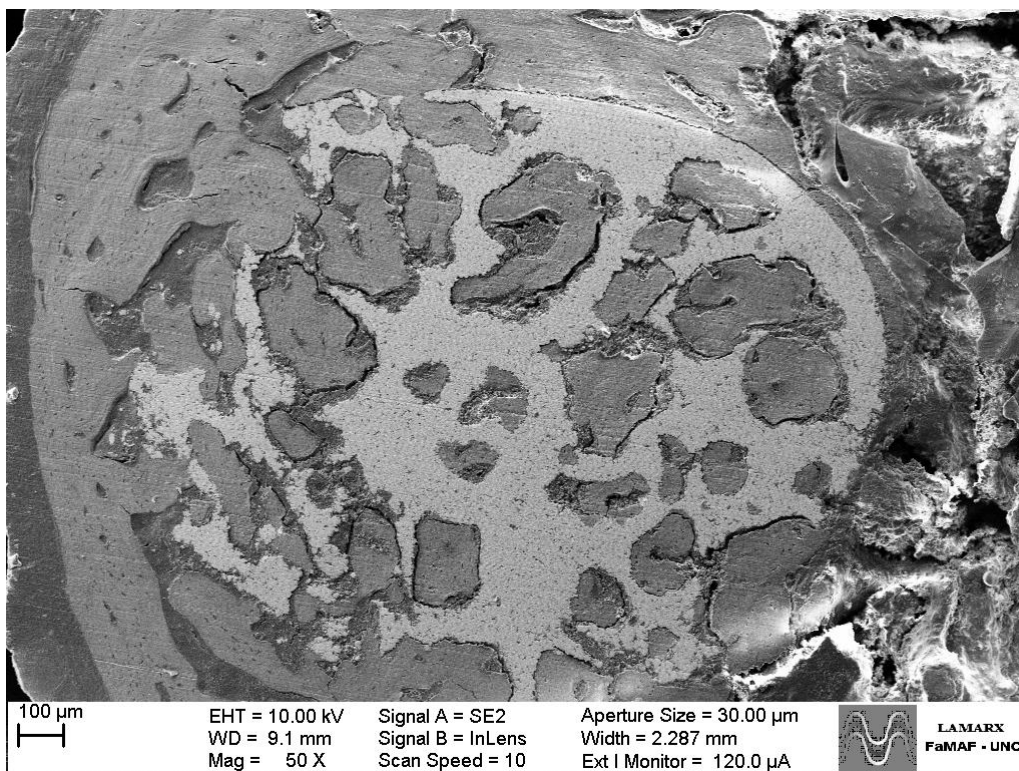


Ilustración 110: SEM - Muestra 54dP (50X)

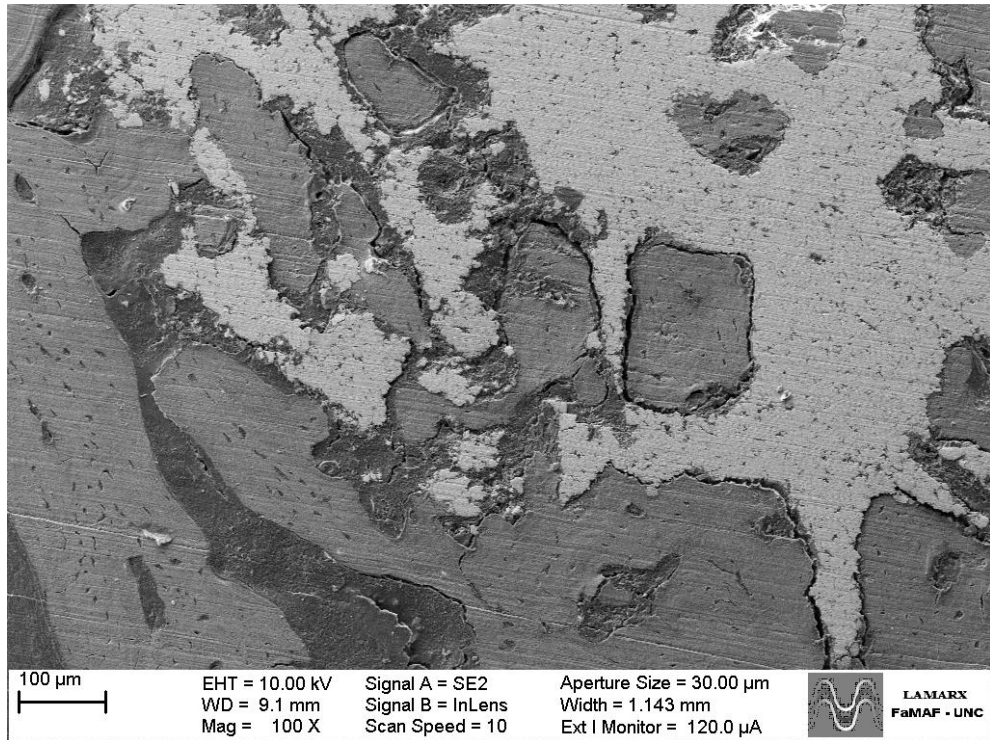


Ilustración 111: SEM - Muestra 54dP (100X)

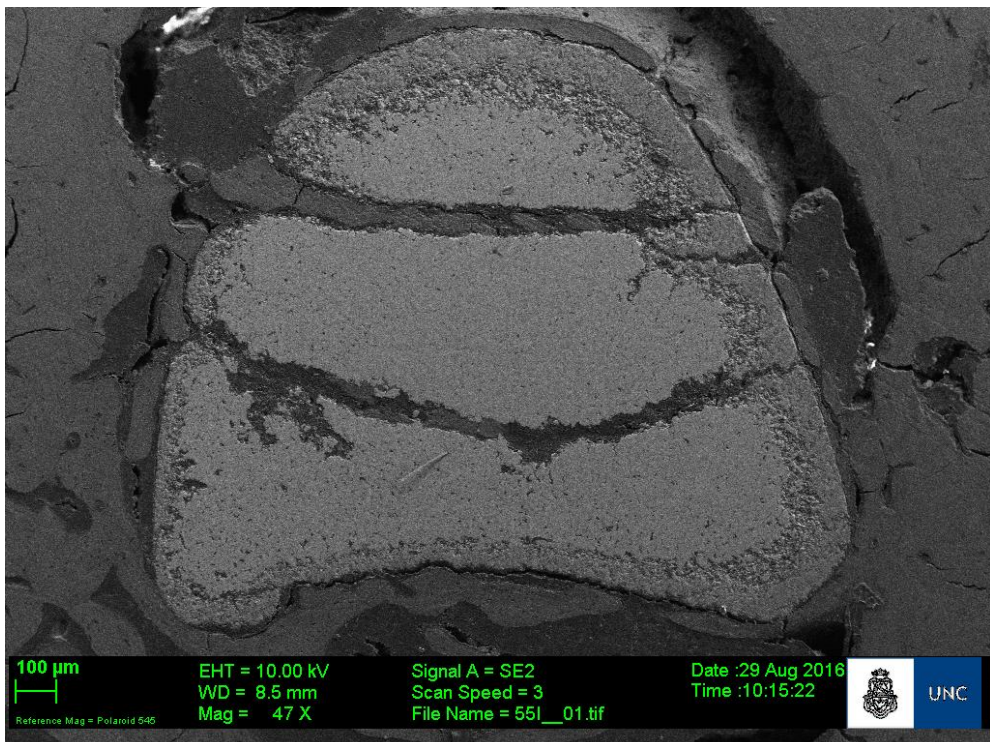


Ilustración 112: SEM - Muestra 55iD (50X)

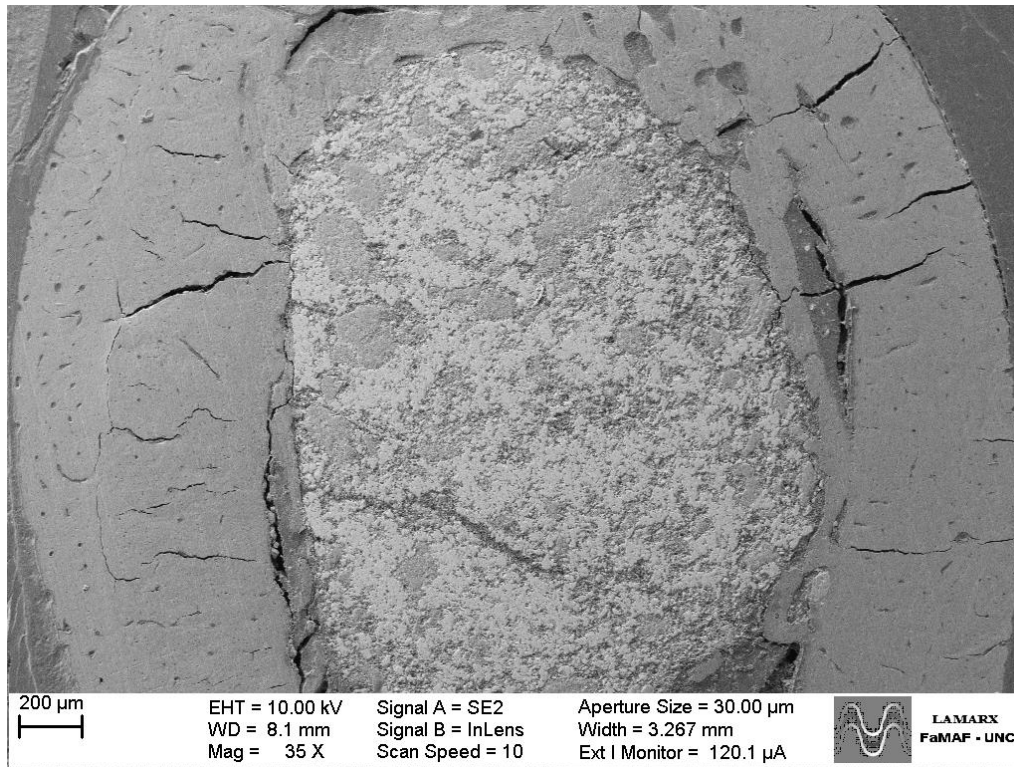


Ilustración 113: SEM - Muestra 55dHA (35X)

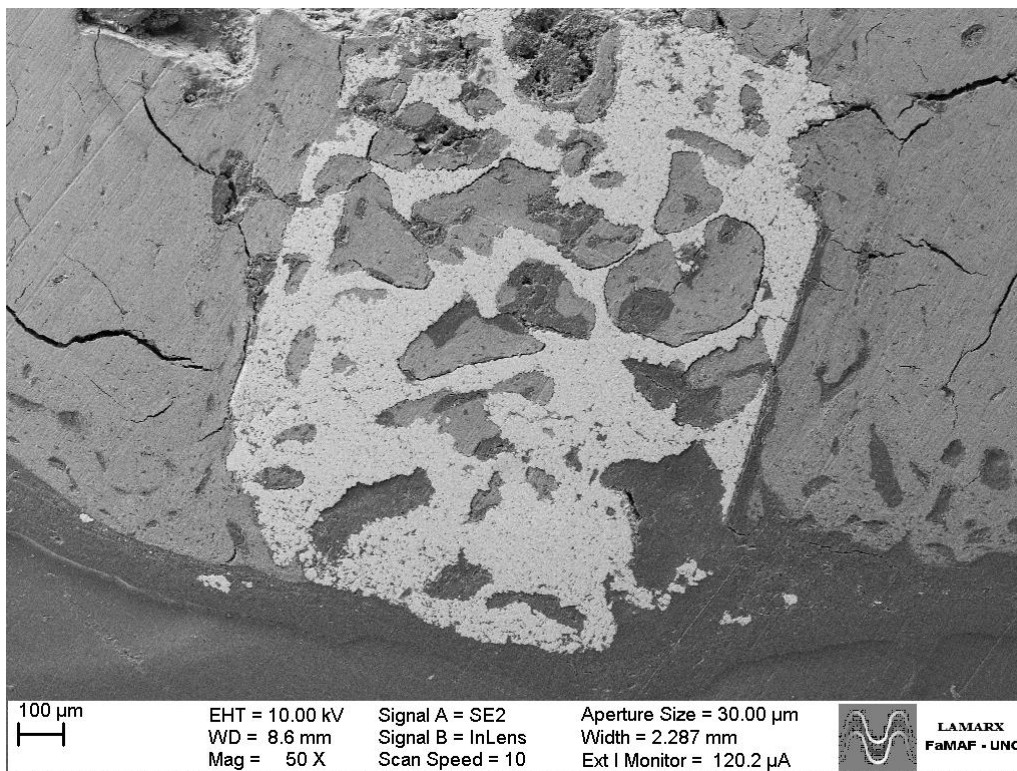


Ilustración 114: SEM - Muestra 56dP (50X)

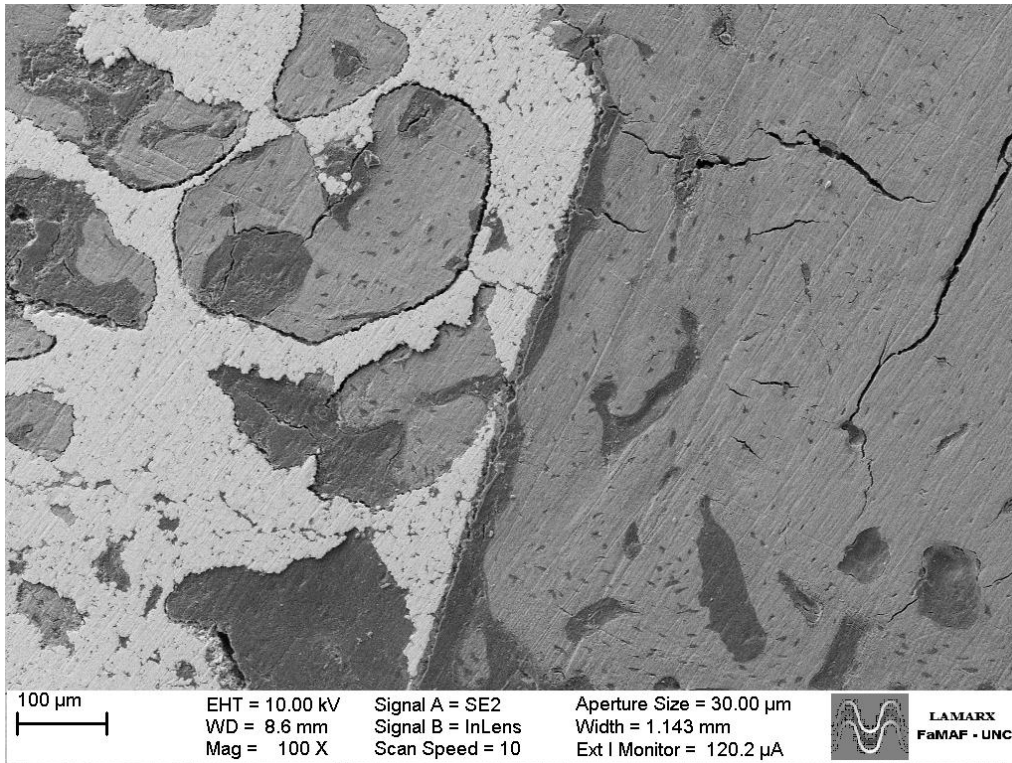


Ilustración 115: SEM - Muestra 56dP (100X)

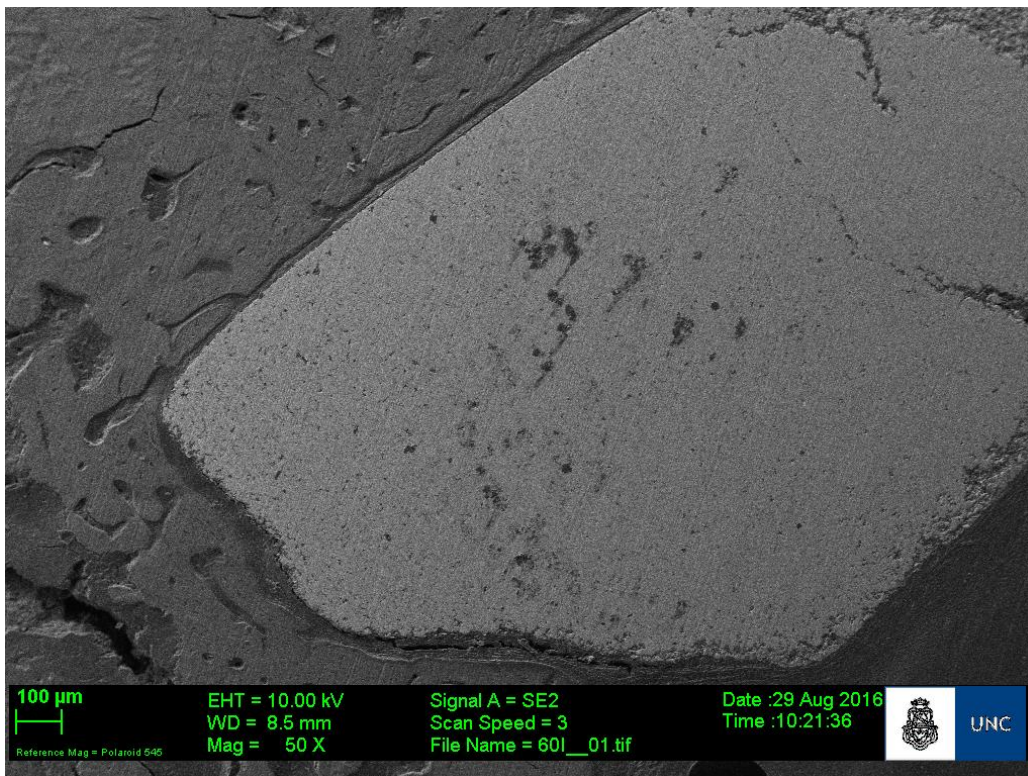


Ilustración 116: SEM - Muestra 60iD (50X)

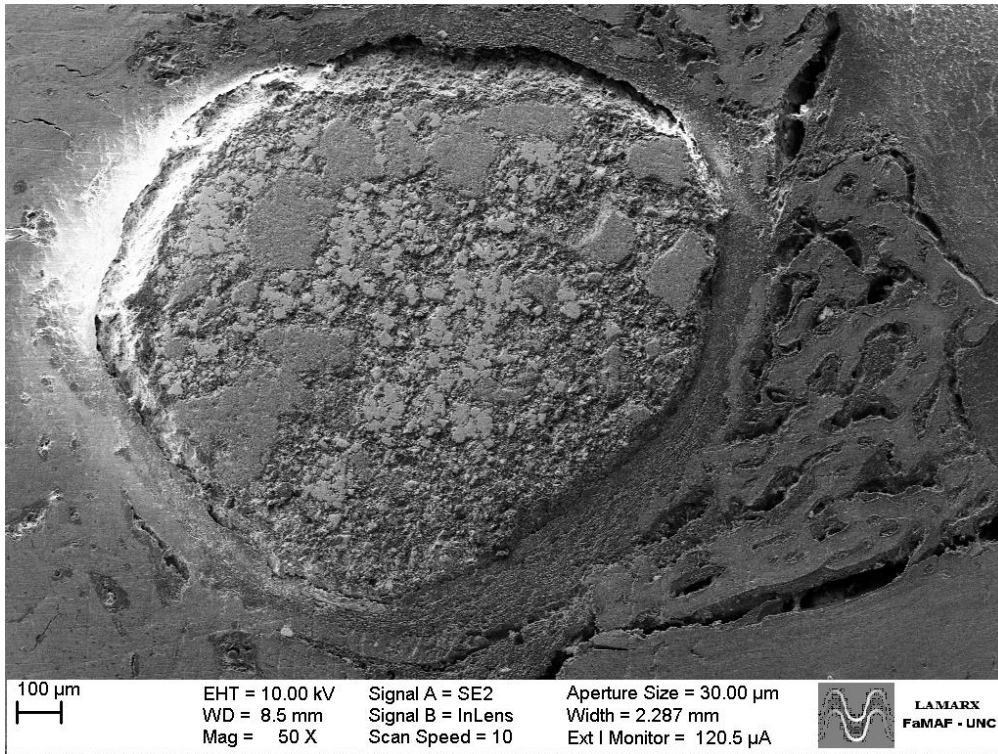


Ilustración 117: SEM - Muestra 60dHA (50X)

Anexo N° 8: Análisis Elemental (EDS)

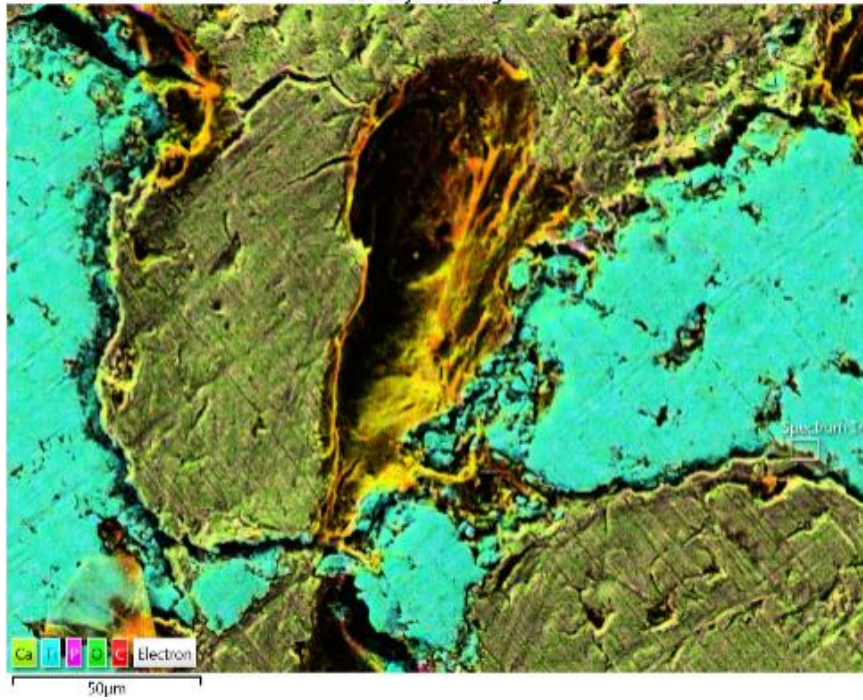
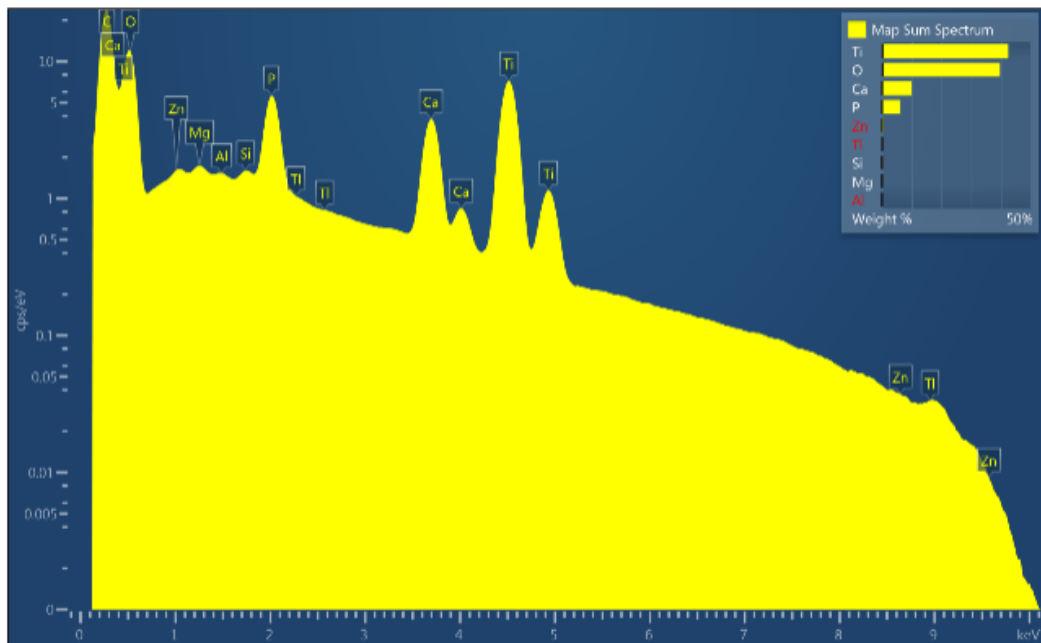
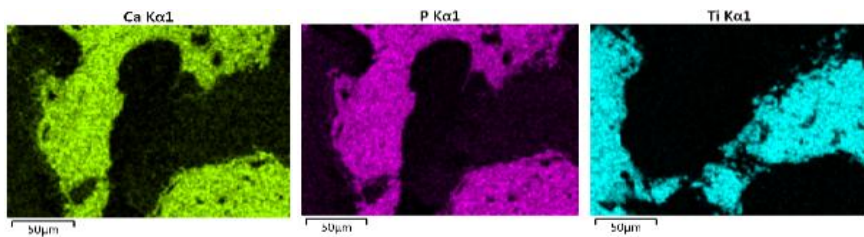


Ilustración 118: EDS - Muestra 4dP



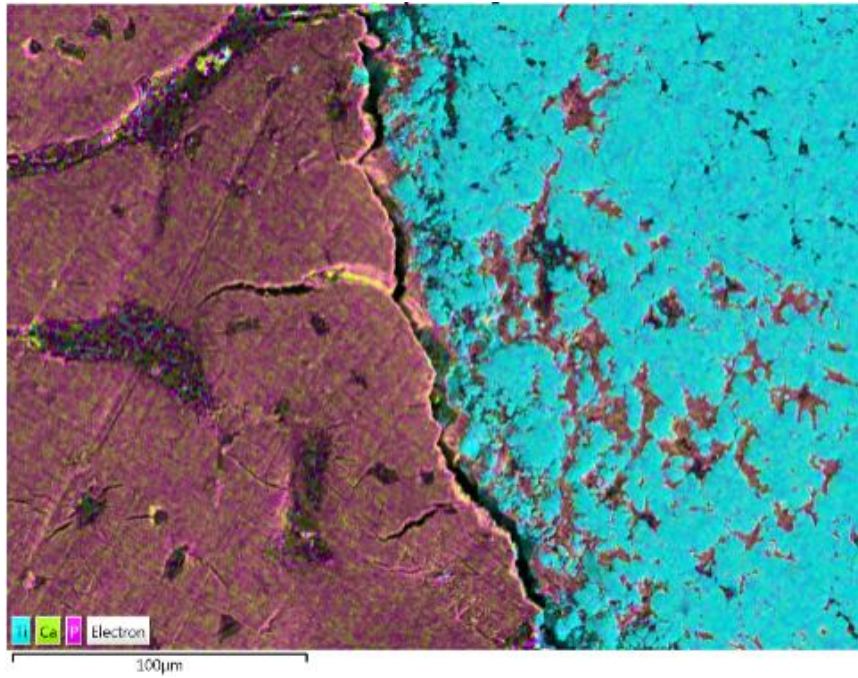
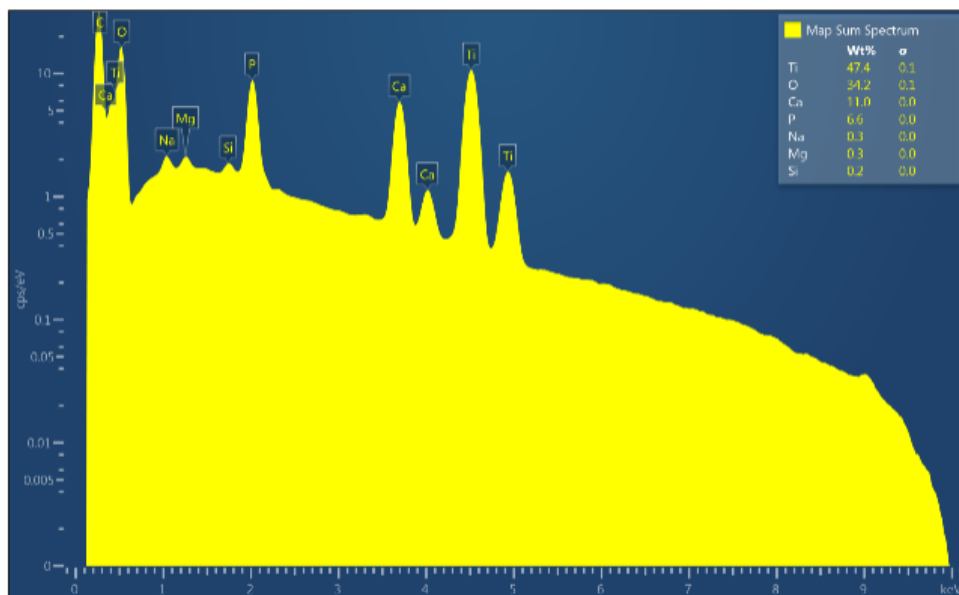
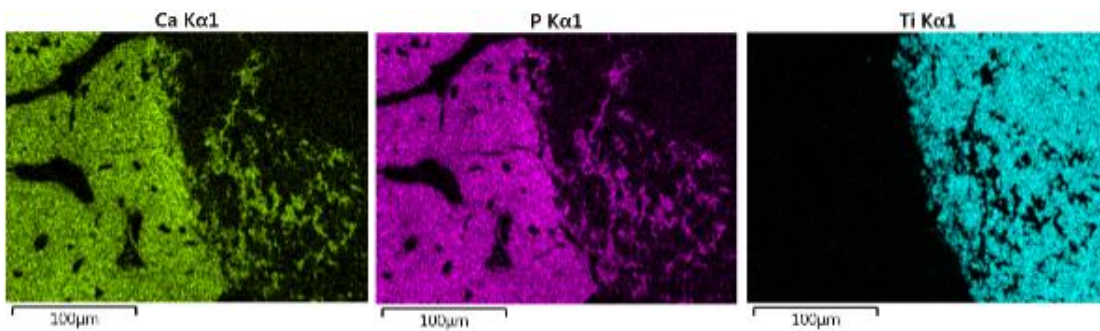


Ilustración 119: EDS - Muestra 5iD



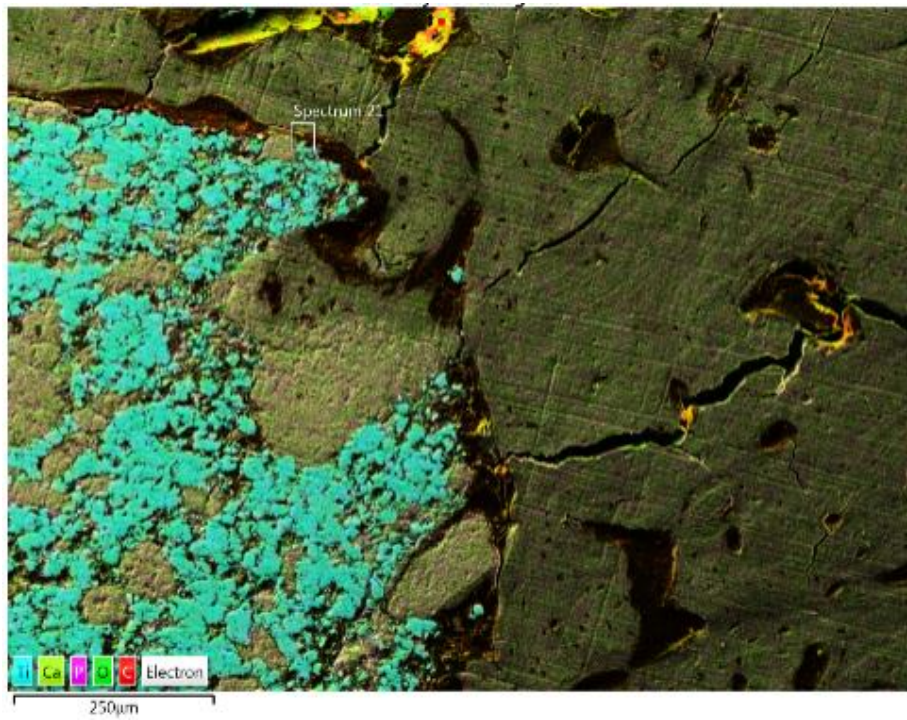


Ilustración 120: EDS- Muestra 5dHA

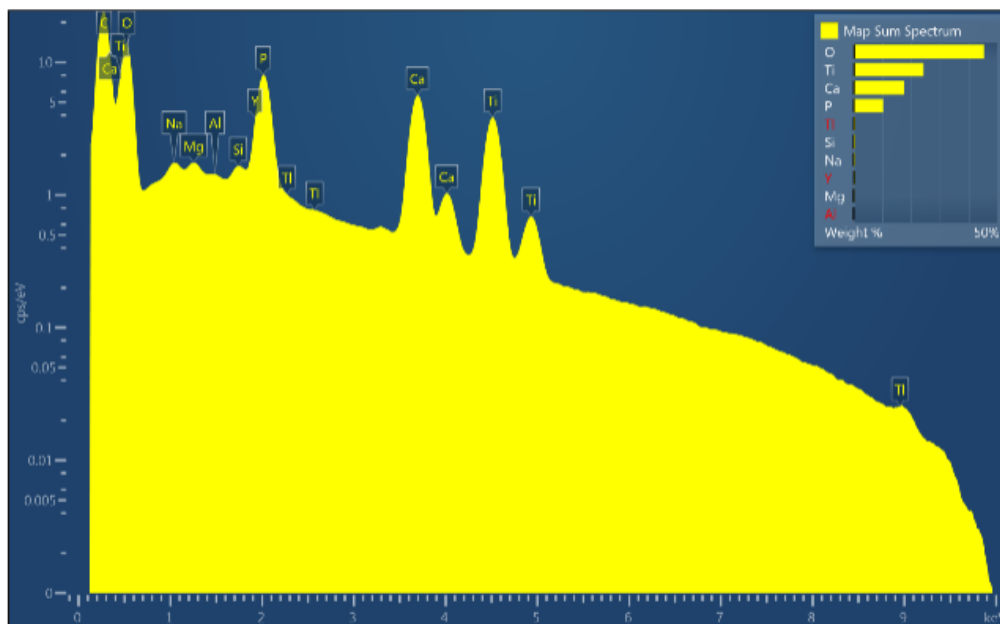
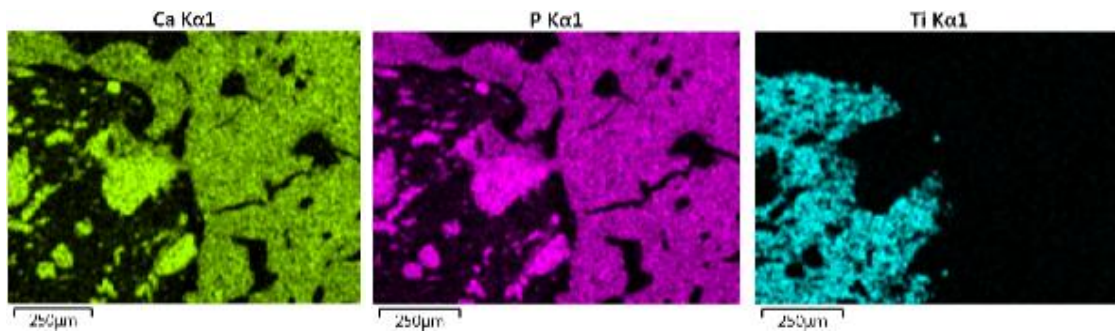
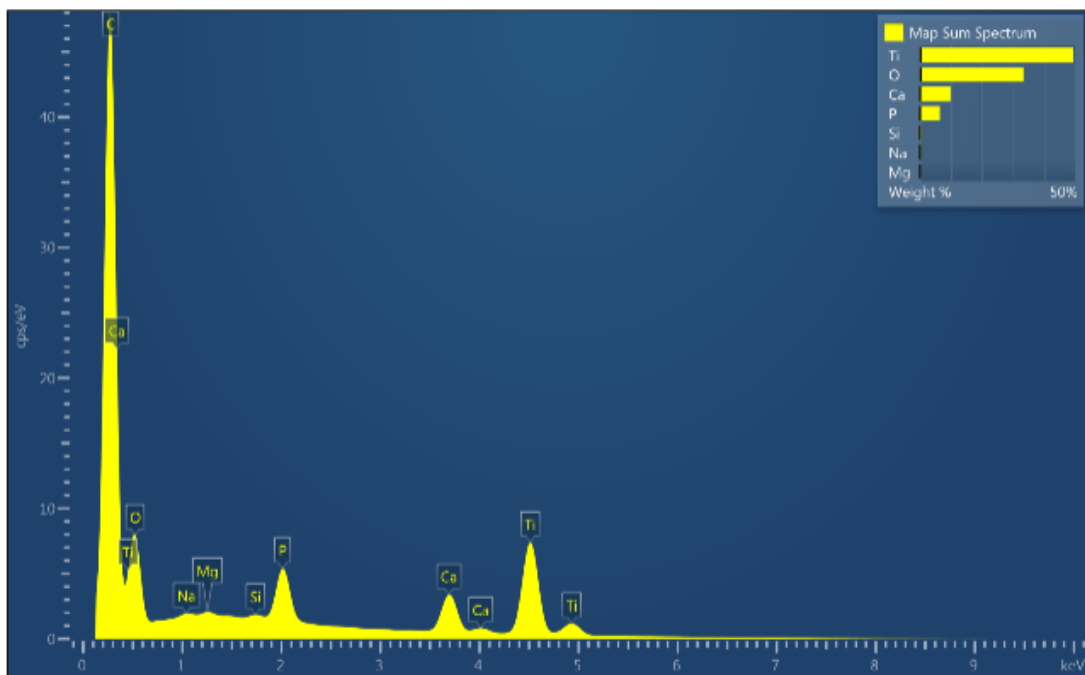
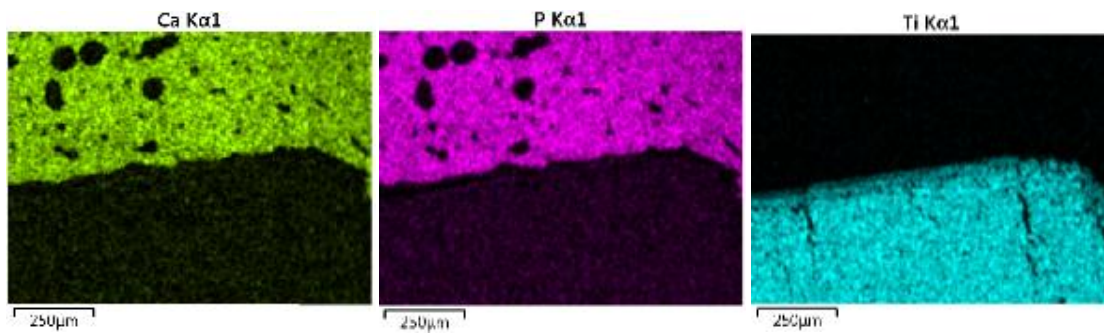




Ilustración 121: EDS-Muestra 6iD



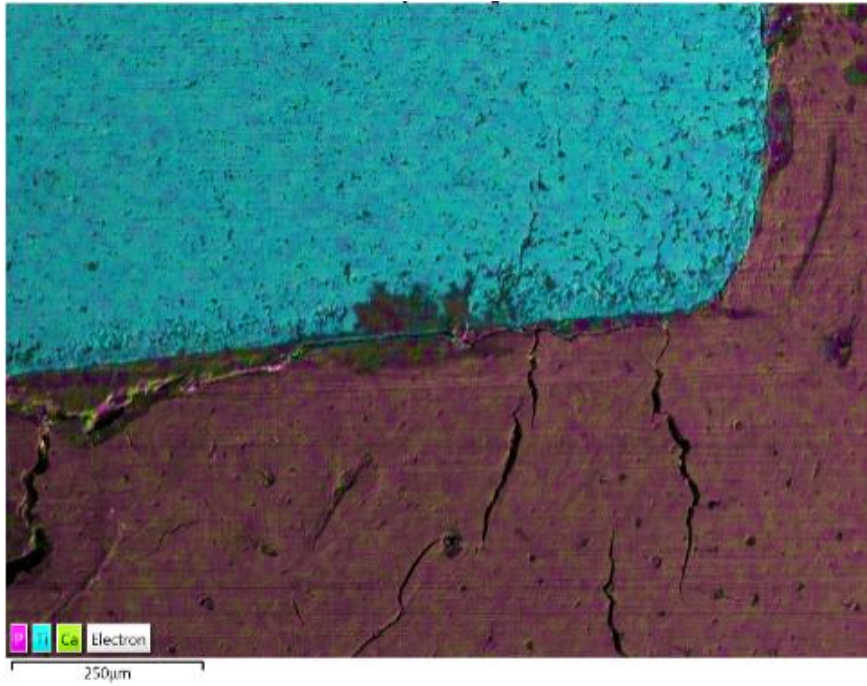
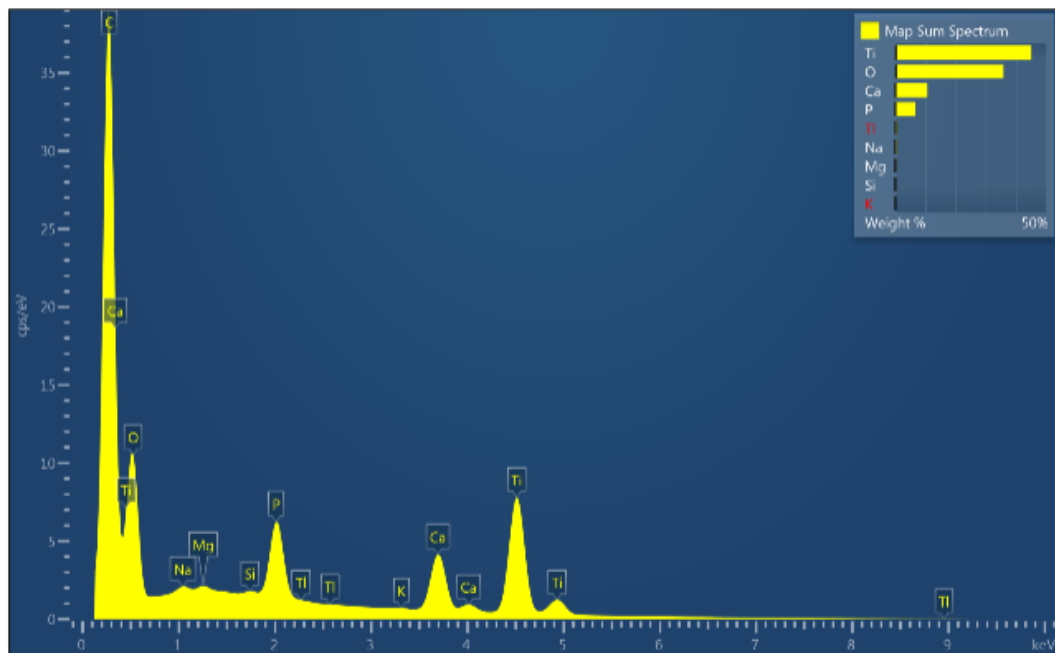
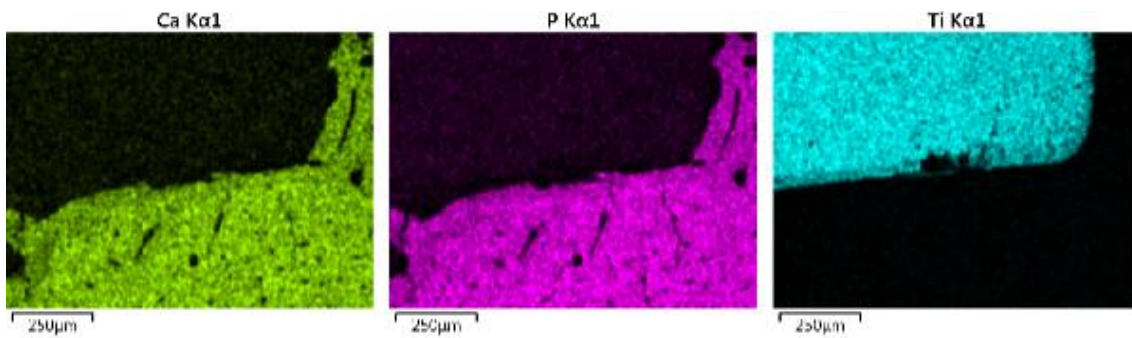


Ilustración 122: EDS-Muestra 44iD



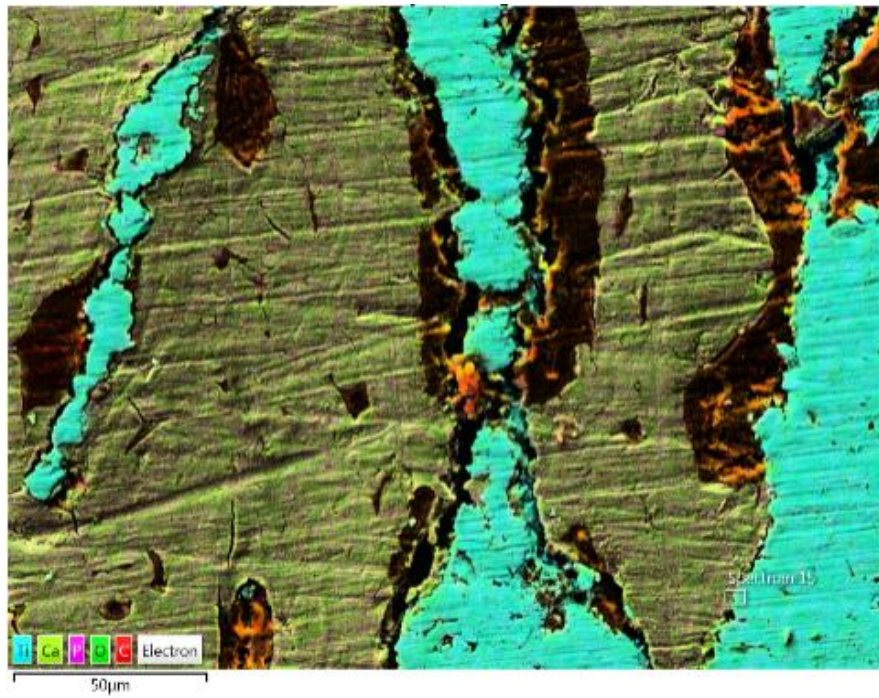
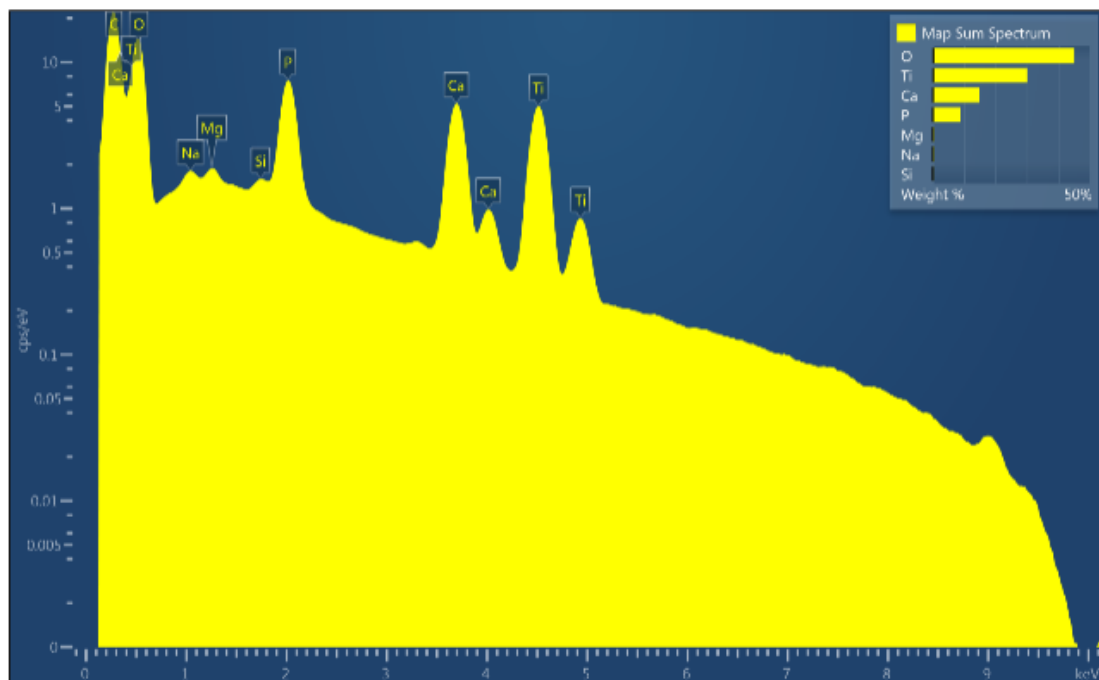
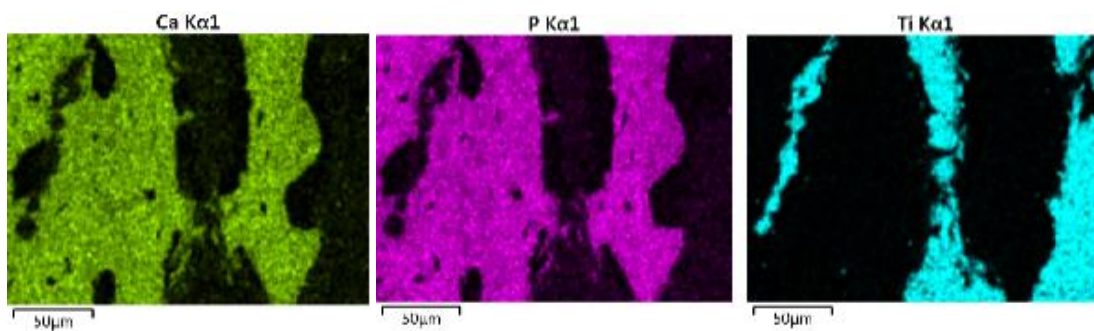


Ilustración 123: EDS-Muestra 44dP



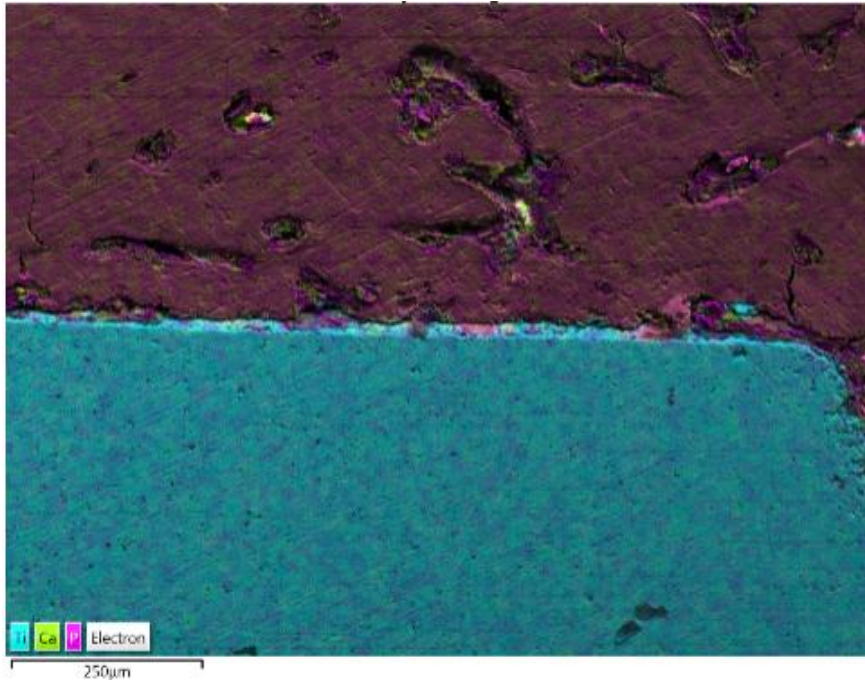
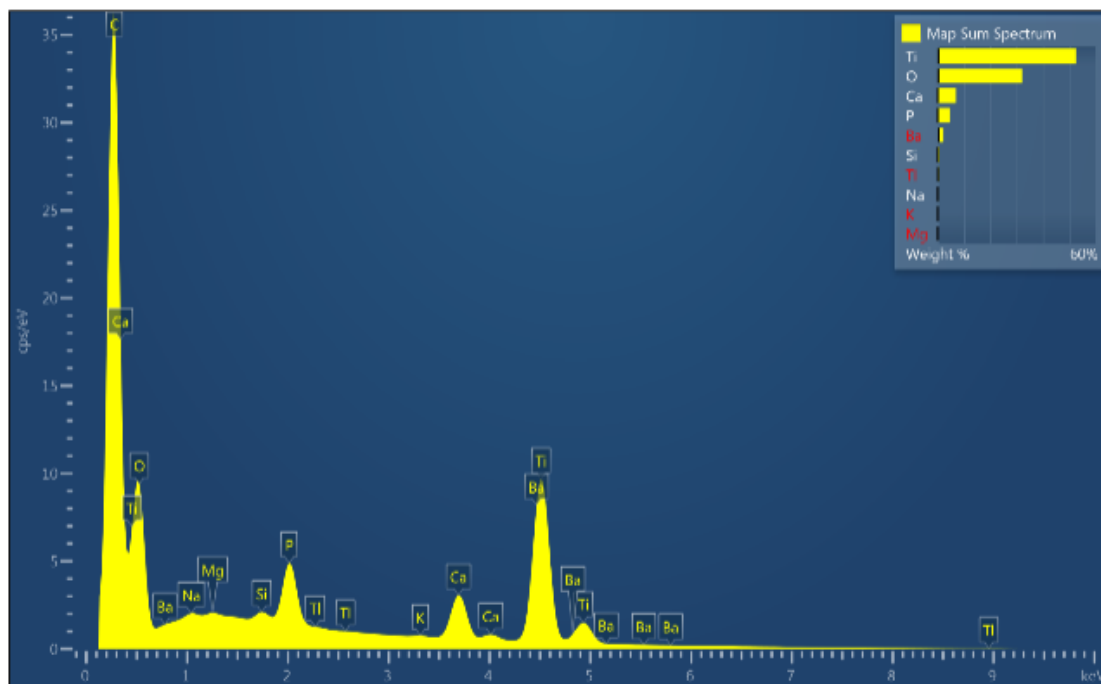
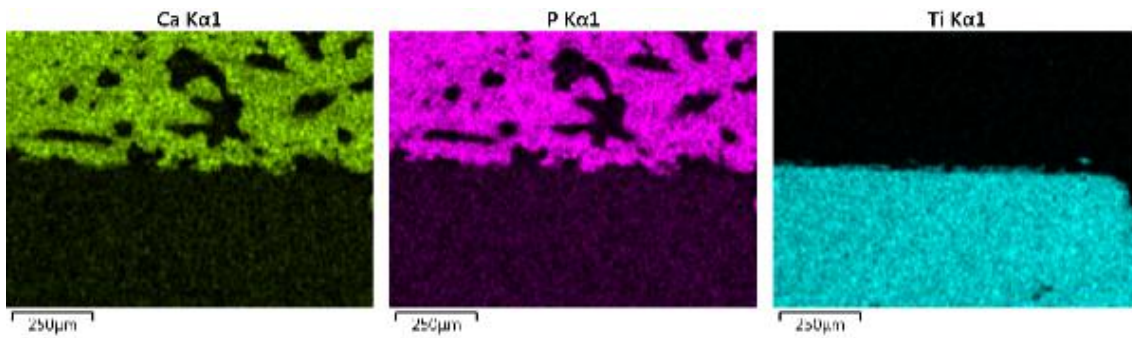


Ilustración 124: EDS-Muestra 45iD



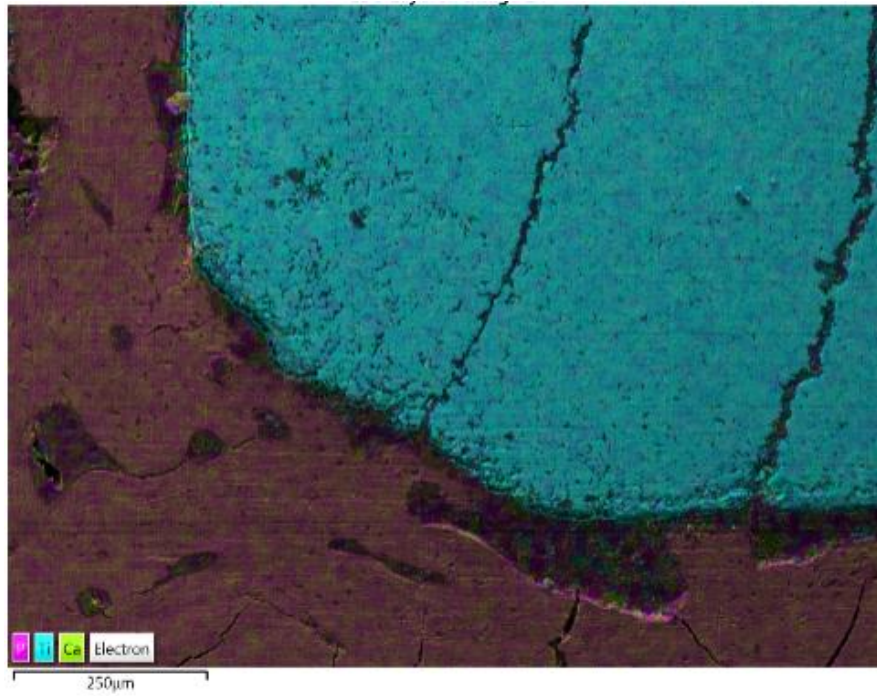
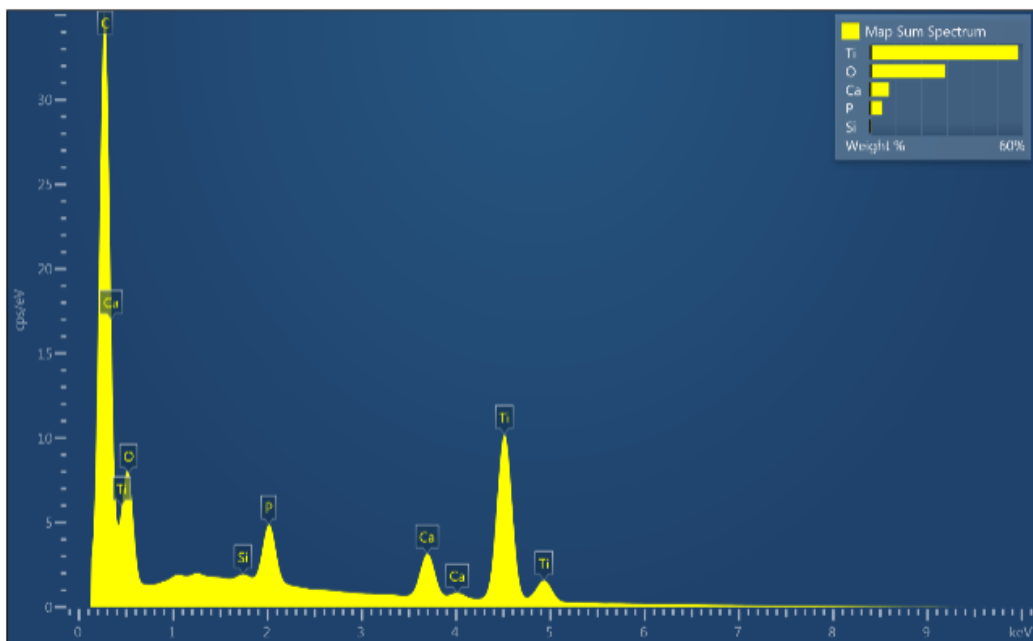
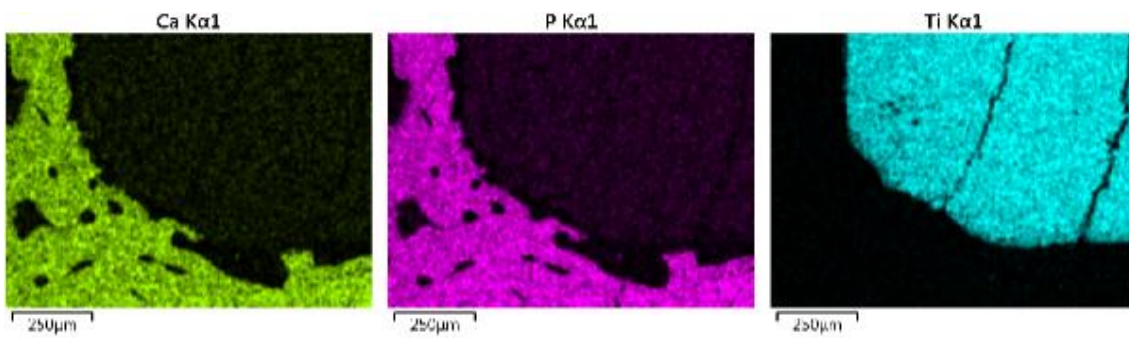


Ilustración 125: EDS-Muestra 46iD



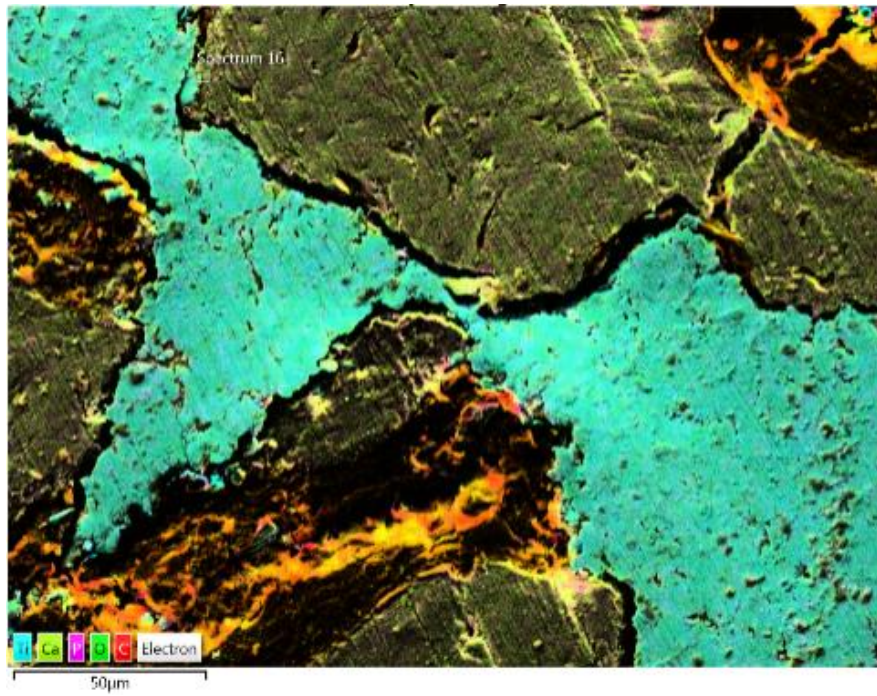
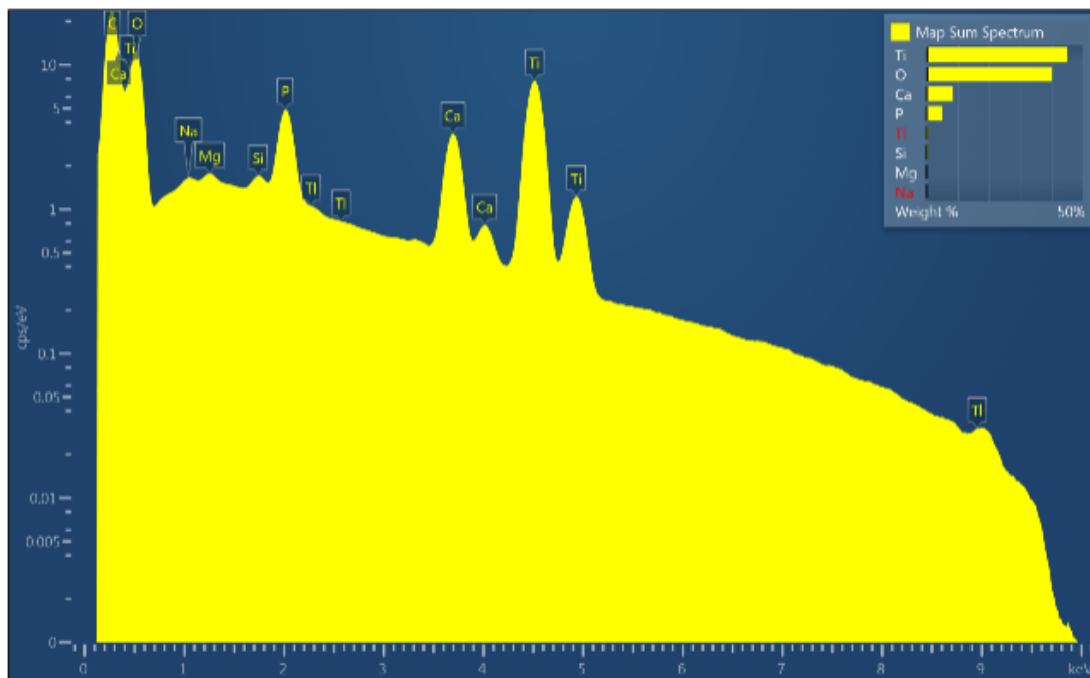
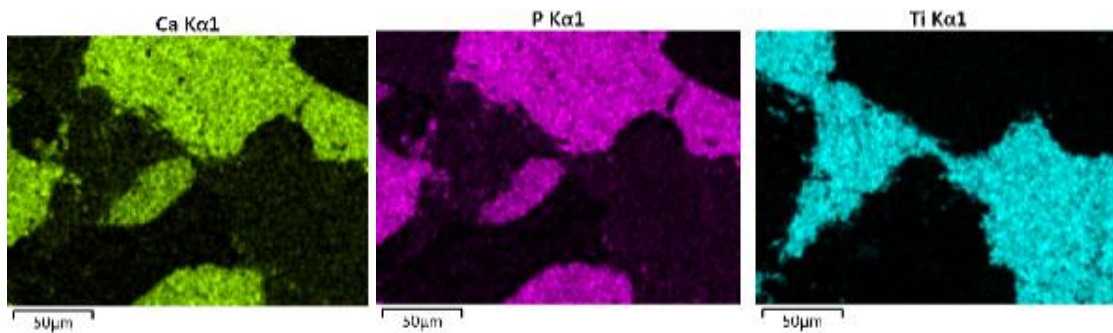


Ilustración 126: EDS-Muestra 46dP



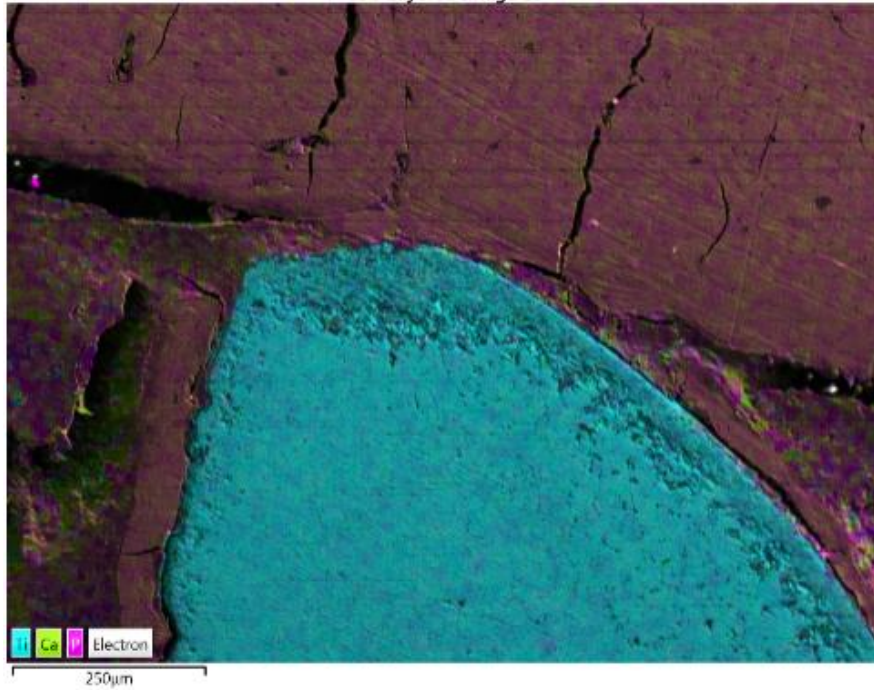
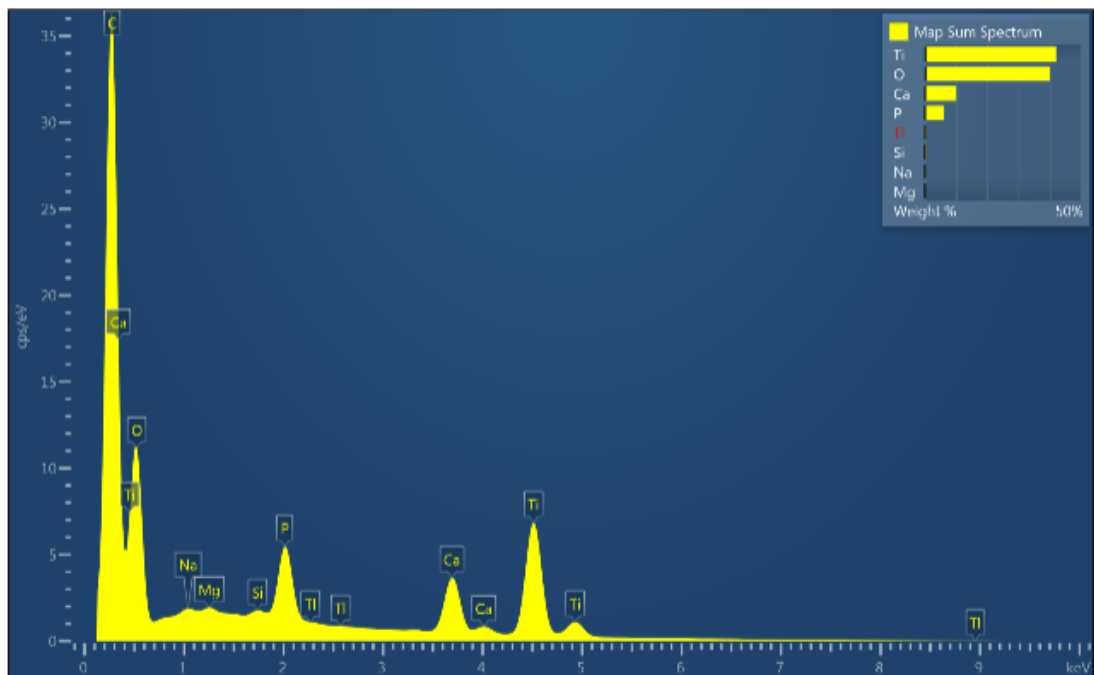
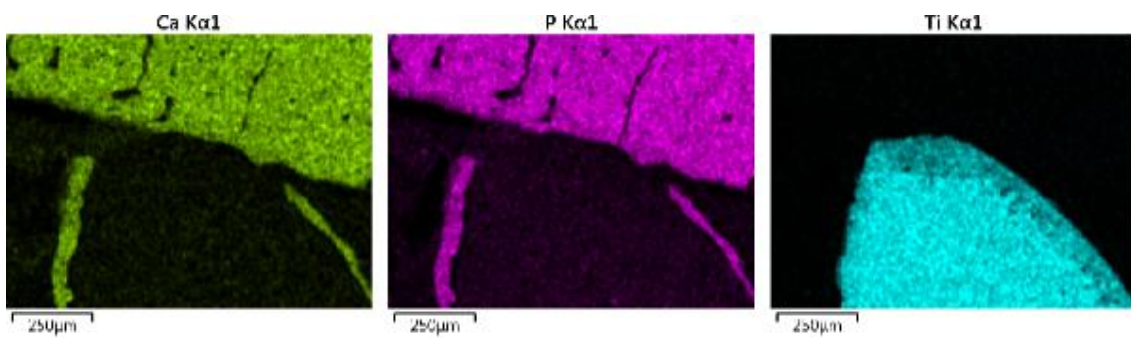


Ilustración 127: EDS-Muestra 50iD



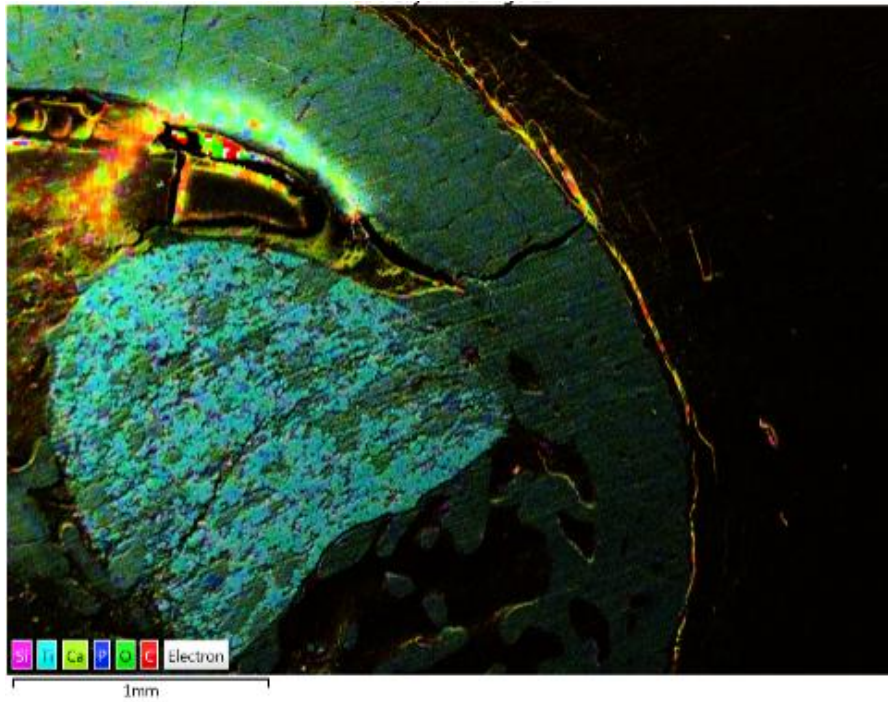
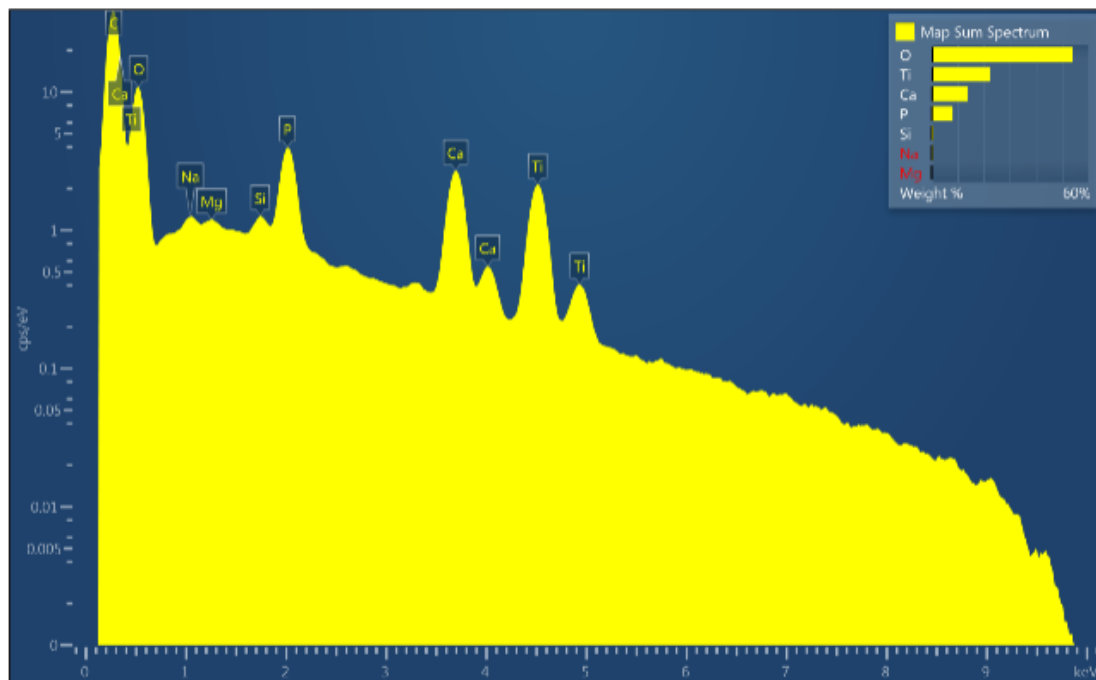
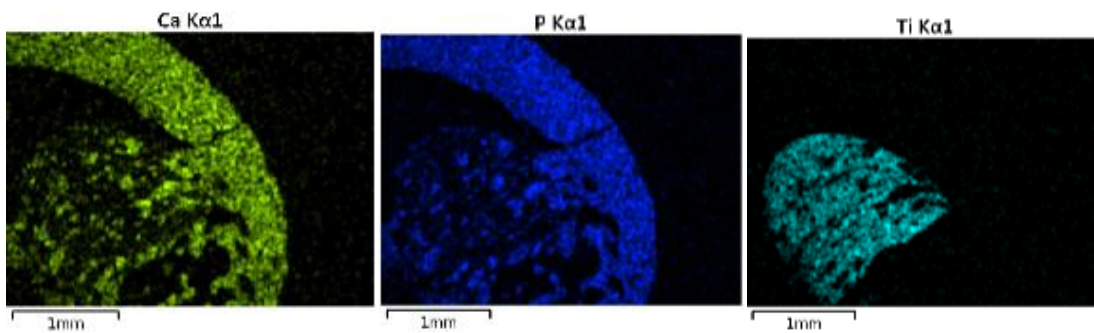


Ilustración 128: EDS-Muestra 50dHA



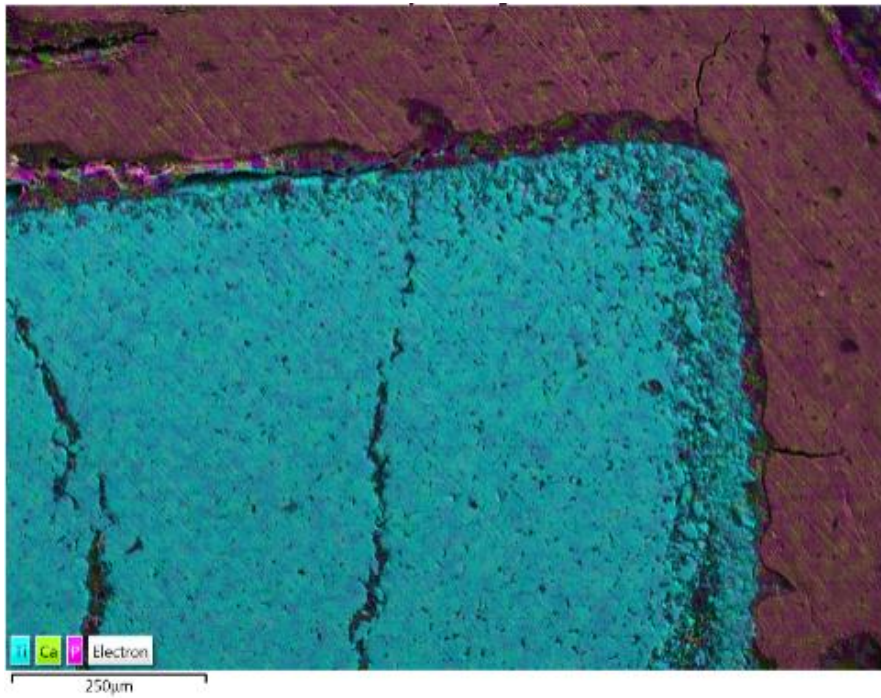
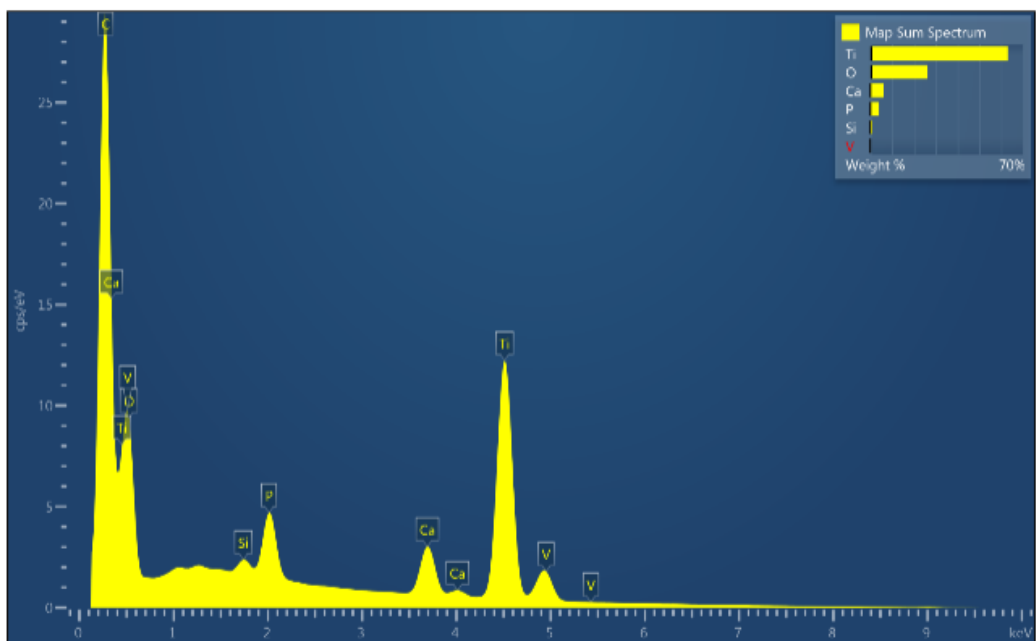
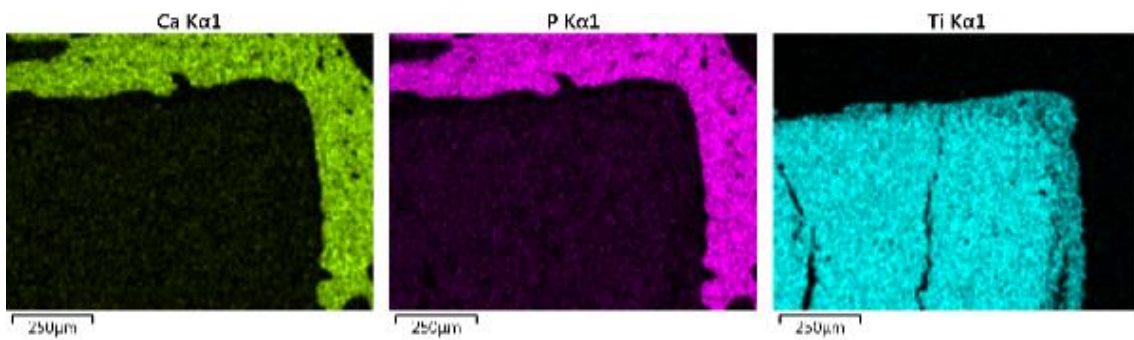


Ilustración 129: EDS-Muestra 54iD



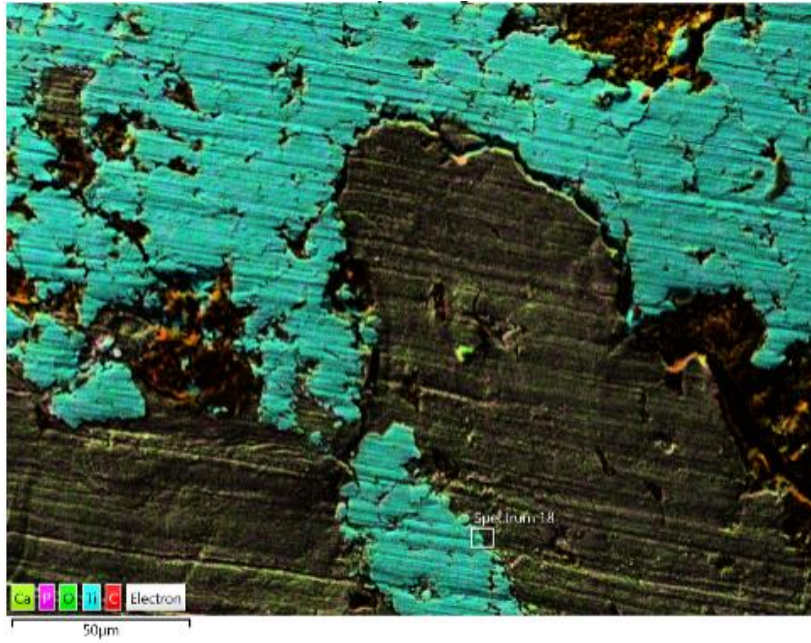
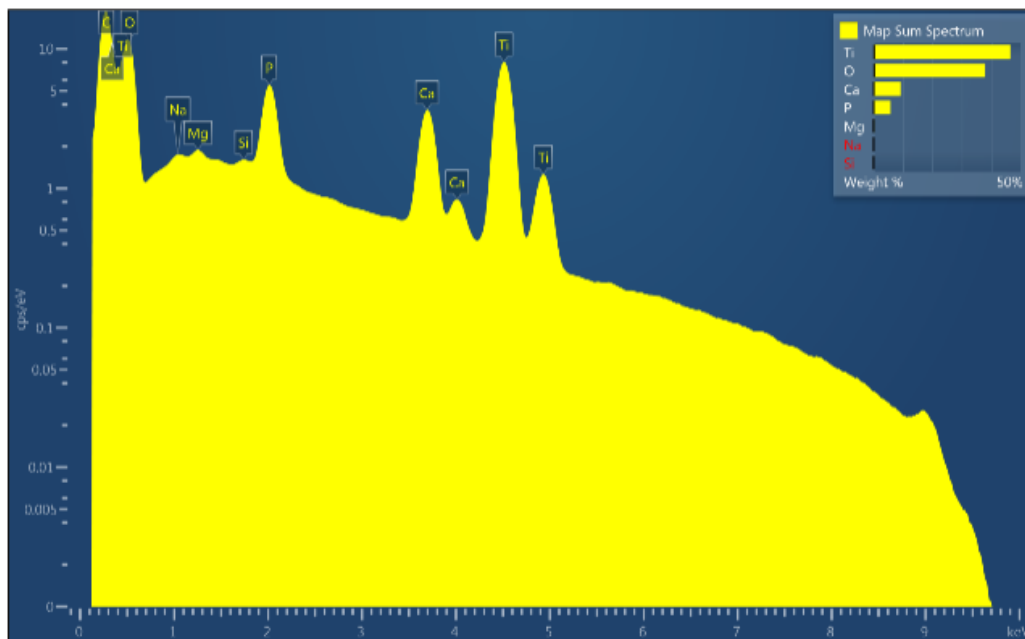
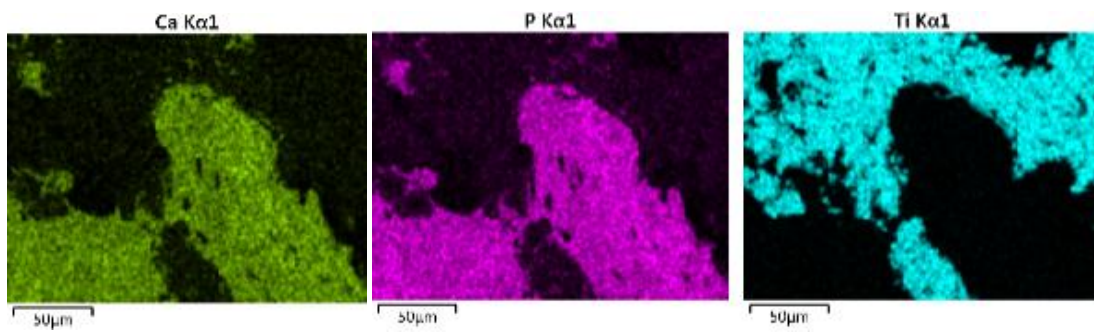


Ilustración 130: EDS-Muestra 54dP



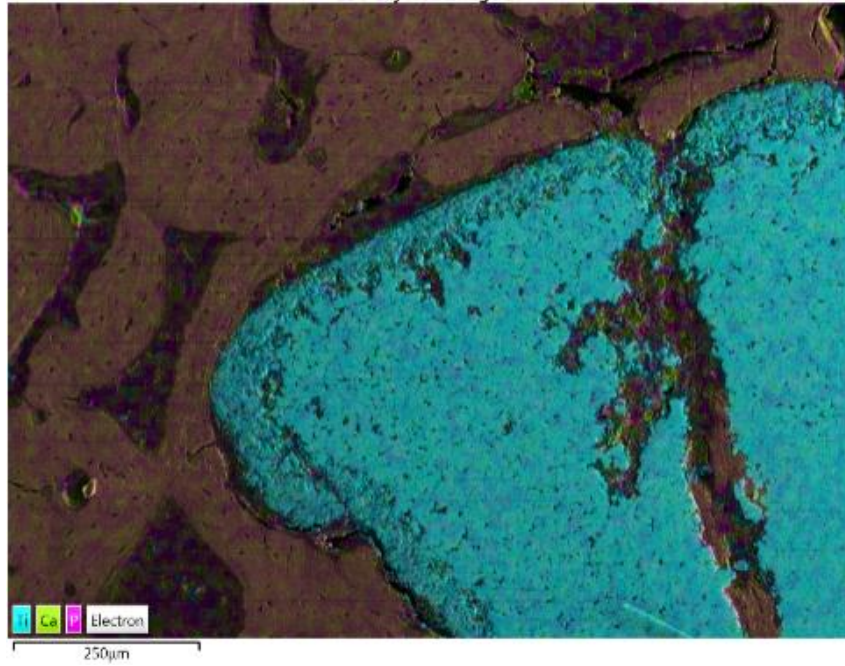
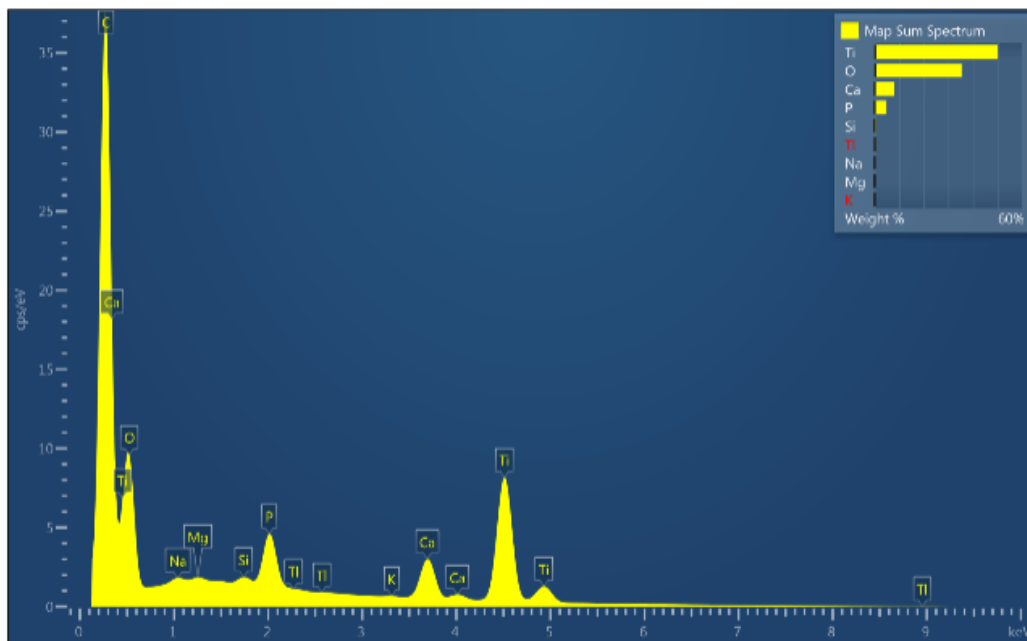
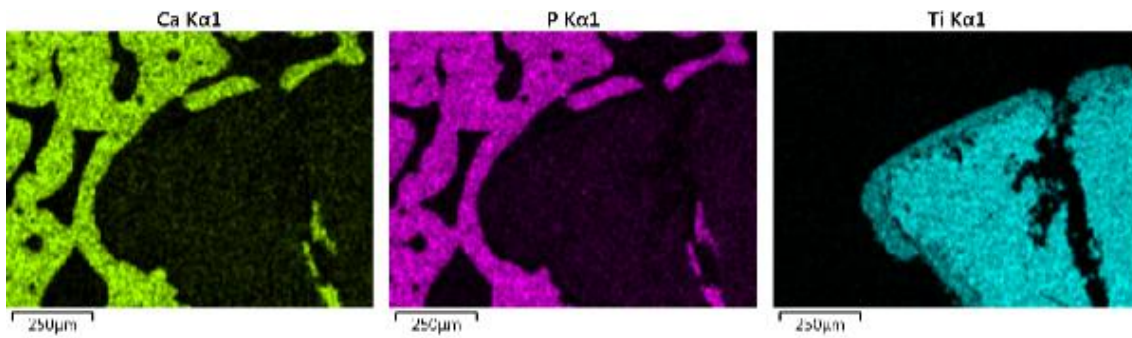


Ilustración 131: EDS-Muestra 55iD



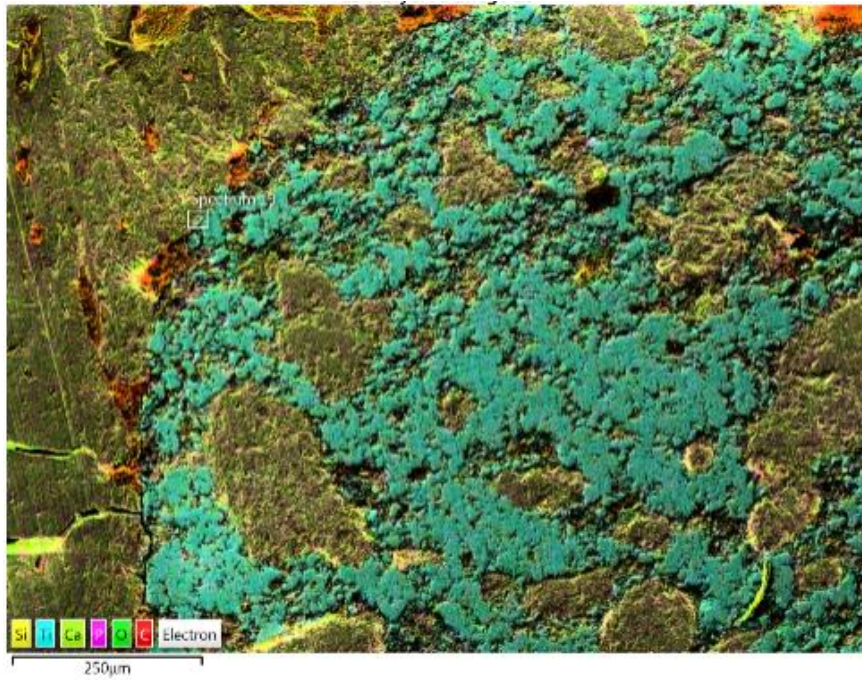
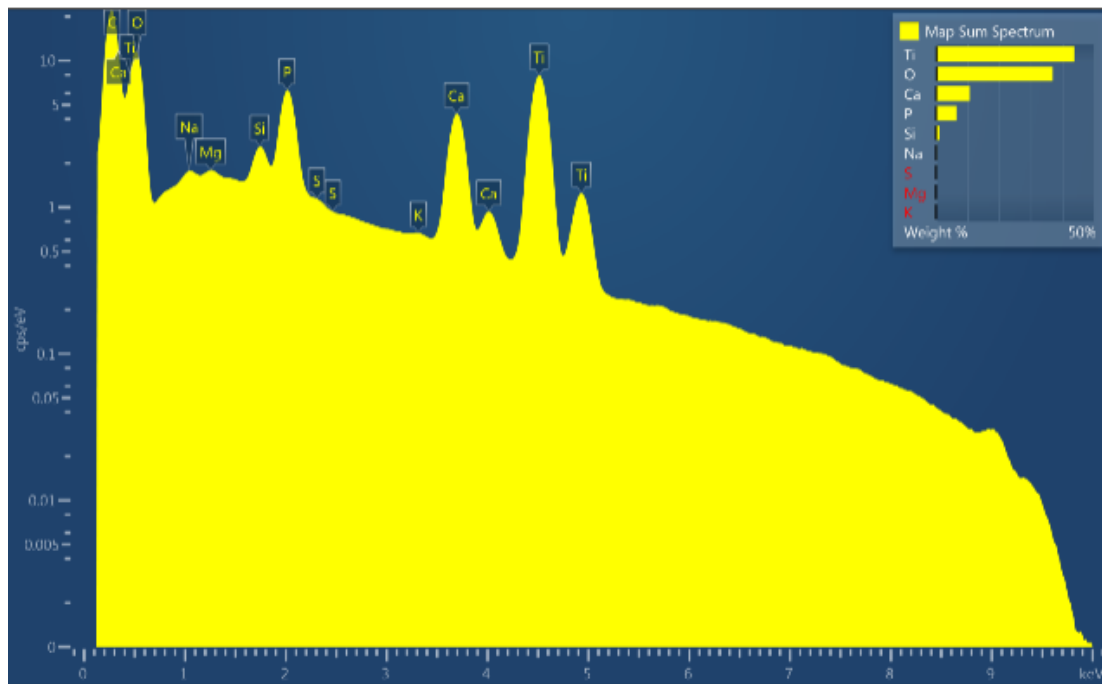
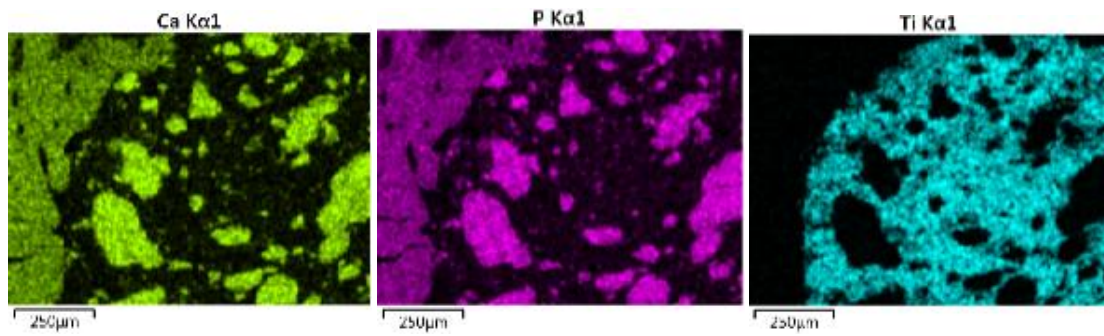


Ilustración 132: EDS-Muestra 55dHA



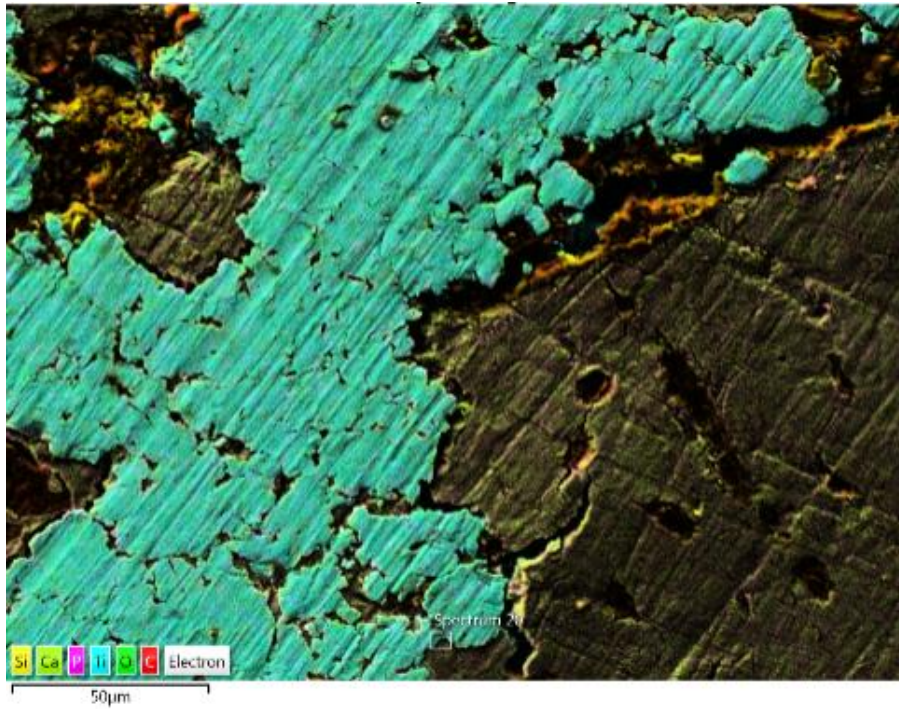
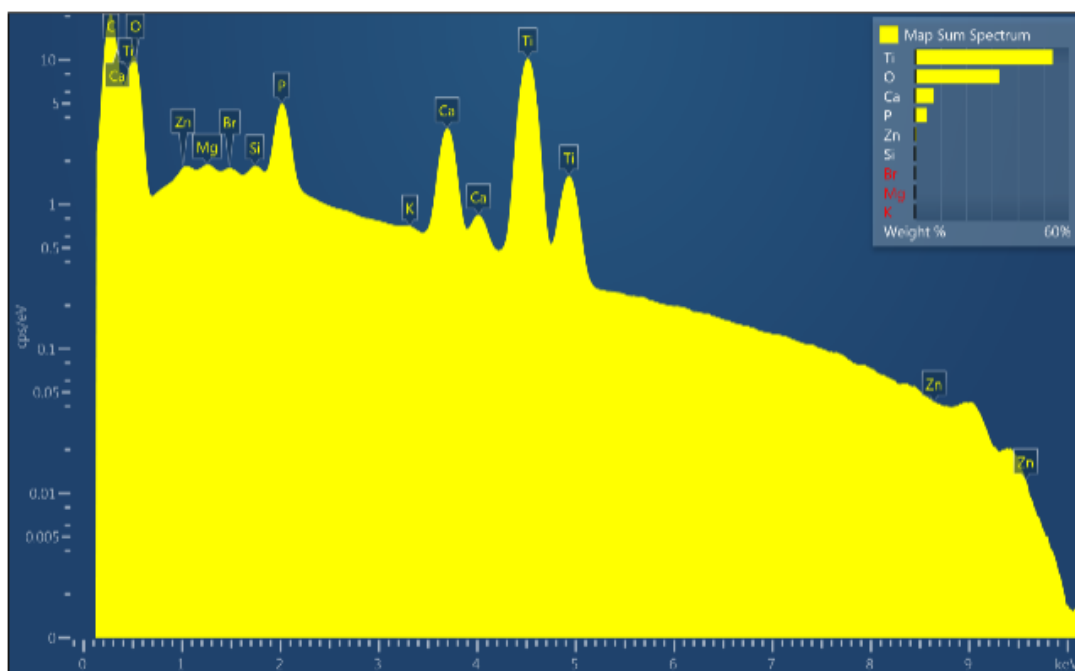
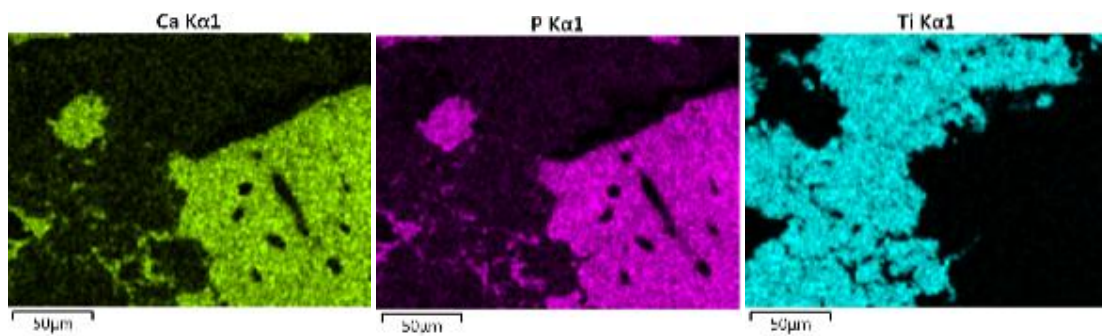


Ilustración 133: EDS-Muestra 56dP



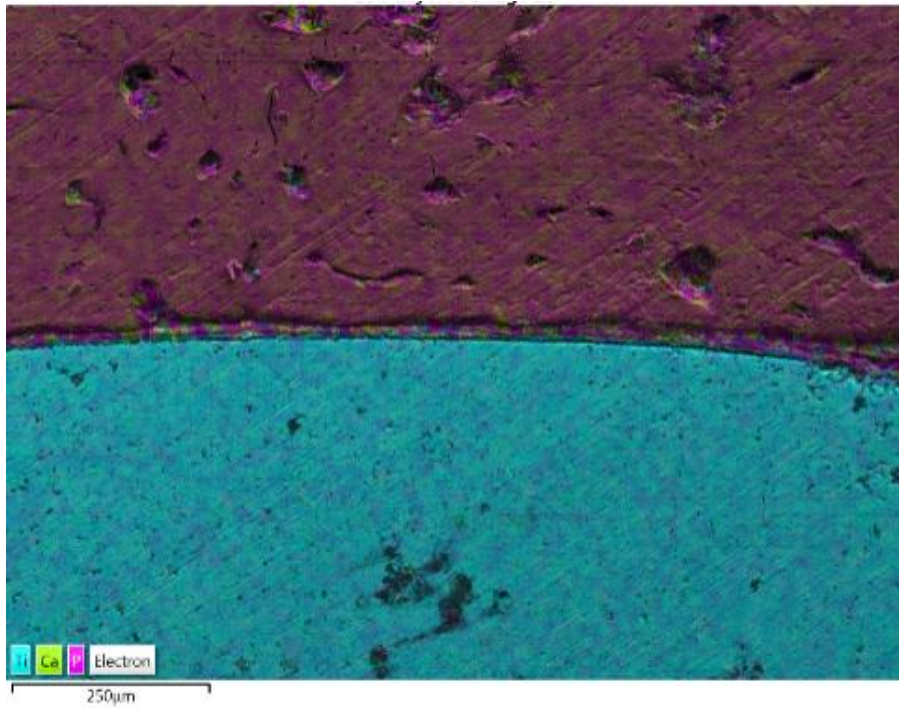
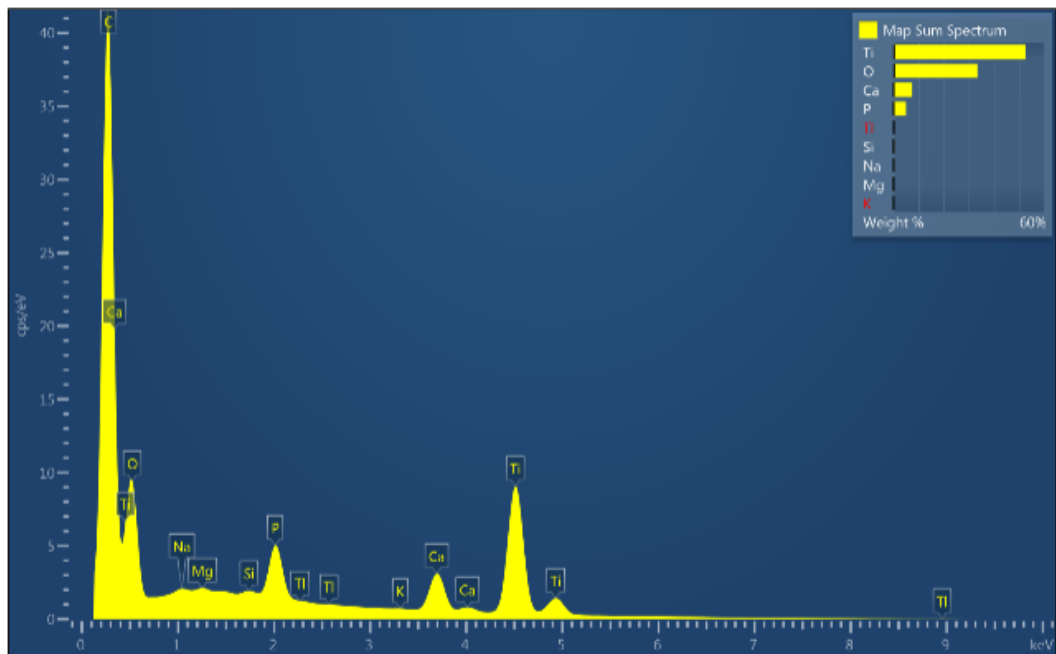
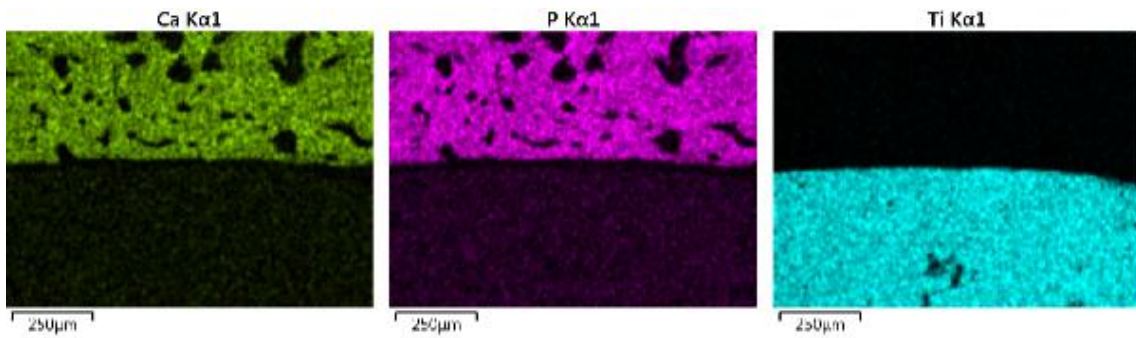


Ilustración 134: EDS-Muestra 60iD



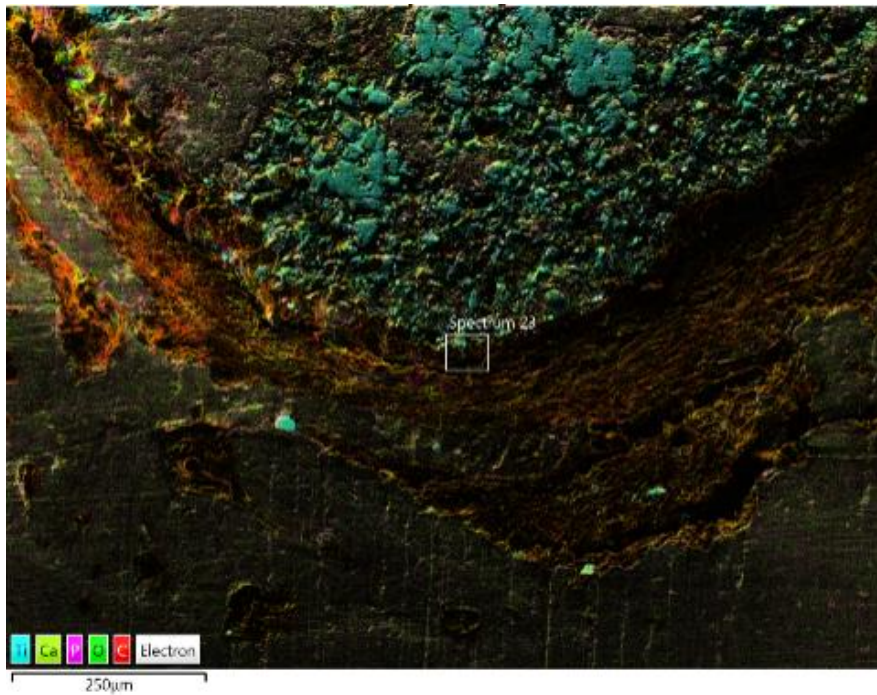
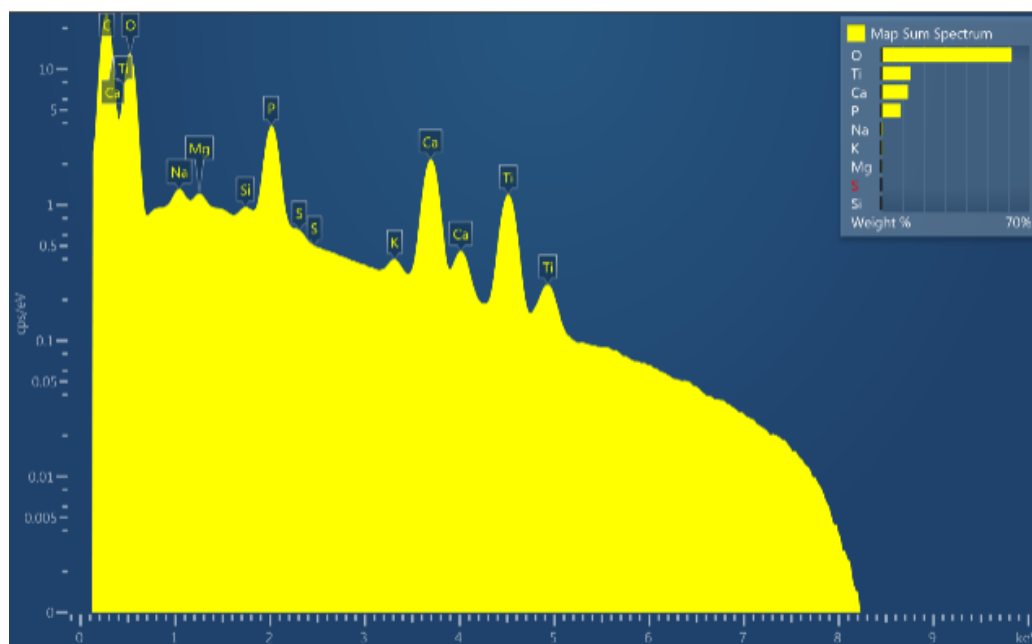
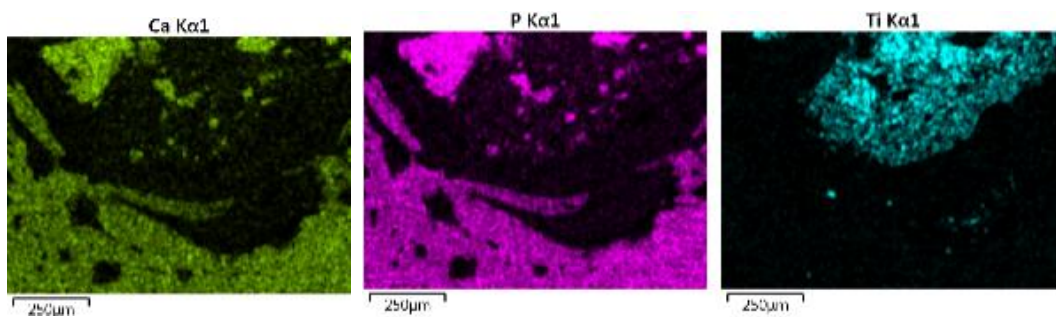


Ilustración 135: EDS-Muestra 60dHA



Anexo Nº 9: Valores de porcentajes de BIC

TITANIO DENSO	
Muestra	BIC [%]
5iD	30,80
6iD	61,30
44iD	33,00
45iD	69,80
46iD	12,00
50iD	55,70
54iD	44,60
55iD	49,80
60iD	37,50

Tabla 10: Valores de BIC Ti denso

TITANIO POROSO	
Muestra	BIC [%]
4dP	29,00
44dP	79,50
46dP	37,30
54dP	82,30
56dP	49,90

Tabla 11: Valores de BIC Ti poroso

TITANIO e HIDROXIAPATITA	
Muestra	BIC [%]
5dHA	27,50
50dHA	74,70
55dHA	83,20
60Dha	29,60

Tabla 12: Valores de BIC Ti e Hidroxiapatita

TITANIO DENSO			
Muestra	%Wt Ca	%Wt P	Ca/P
5iD	7,40	4,50	1,64
6iD	5,97	3,88	1,54
44iD	10,65	6,58	1,61
45iD	6,94	4,54	1,53
46iD	7,35	4,70	1,56
50iD	10,04	6,11	1,64
54iD	6,09	3,94	1,55
55iD	7,79	4,86	1,60
60iD	7,44	4,97	1,50
Media	7,74	4,90	1,57

Tabla 13: Valores de Ca y P para muestras de titanio denso

TITANIO POROSO			
Muestra	%Wt Ca	%Wt P	Ca/P
4dP	6,34	3,31	1,92
44dP	8,68	5,08	1,71
46dP	20,02	11,86	1,69
54dP	11,67	7,16	1,63
56dP	8,27	4,04	2,04
Media	11,00	6,29	1,80

Tabla 14: Valores de Ca y P para muestras de titanio poroso

TITANIO e HIDROXIAPATITA			
Muestra	%Wt Ca	%Wt P	Ca/P
5dHA	15,30	9,17	1,67
50dHA	23,11	13,46	1,72
55dHA	12,95	8,55	1,51
60dHA	3,59	1,87	1,92
Media	13,74	8,26	1,71

Tabla 15: Valores de Ca y P para muestras de titanio e hidroxiapatita

Anexo N° 10: Valores Estadísticos

BIC	Material			Estadístico	Error Estándar	
	Titanio denso Grupo 1	Media			44,1400	10,27179
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior		15,6209	
			Límite superior		72,6591	
		Media recortada al 5%			44,5000	
		Mediana			44,6000	
		Varianza			527,548	
		Desviación estándar			22,9684	
		Mínimo			12,00	
		Máximo			69,80	
Rango				57,80		

Tabla 16: Valores estadísticos descriptivos para Ti denso-grupo 1

BIC	Material			Estadístico	Error Estándar	
	Titanio poroso	Media			55,6000	10,86057
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior		25,4462	
			Límite superior		85,7538	
		Media recortada al 5%			55,5944	
		Mediana			49,9000	
		Varianza			589,760	
		Desviación estándar			24,2849	
		Mínimo			29,00	
		Máximo			82,30	
Rango				53,30		

Tabla 17: Valores estadísticos descriptivos para Ti poroso

BIC	Material			Estadístico	Error Estándar	
	Titanio denso Grupo 2	Media			43,4750	5,67482
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior		25,4152	
			Límite superior		61,5348	
		Media recortada al 5%			43,4972	
		Mediana			43,6750	
		Varianza			128,814	
		Desviación estándar			11,3496	
		Mínimo			30,80	
		Máximo			55,75	
Rango				24,95		

Tabla 18: Valores estadísticos descriptivos para Ti denso-grupo 2

BIC	Material			Estadístico	Error Estándar	
	Titanio-hidroxiapatita	Media			53,7675	14,6703
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior		7,0800	
			Límite superior		100,4550	
		Media recortada al 5%			53,5878	
		Mediana			52,1500	
		Varianza			860,872	
		Desviación estándar			29,34062	
		Mínimo			27,50	
		Máximo			83,27	
Rango				55,77		

Tabla 19: Valores estadísticos descriptivos para Ti e Hidroxiapatita

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Bic	18	0,07	0	45,15	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	546,62	2	273,31	0,55	0,5874
Titanio	546,62	2	273,31	0,55	0,5874
Error	7434,59	15	495,64		
Total	7981,21	17			
Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=29,02262					
Error: 495,6393 gl: 15					
Titanio	Medias				E.E.
Titanio_denso	43,83				7,42
Titanio_hidroxi	53,75				11,13
Titanio_poroso	55,6				9,96
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

Tabla 20: Prueba ANOVA

Prueba T (muestras apareadas)								
Columna1	Obs(1)	Obs(2)	Media(dif)	Media (1)	Media (2)	E(dif)	T	Bilateral
RATA	Denso	HA	-10,3	43,45	53,75	0,37	0,68	0,5462
Prueba T (muestras apareadas)								
Columna1	obs(1)	Obs(2)	Media(dif)	Media (1)	Media (2)	E(dif)	T	Bilateral
RATA	Denso	Poroso	11,46	44,14	55,6	6,3	0,55	0,6094

Tabla 21: Prueba t para muestras apareadas