

121
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

**PRUEBAS ESTANDAR PARA MATERIALES
(METALICOS Y CERAMICOS)
POTENCIALMENTE BIOCOMPATIBLES**

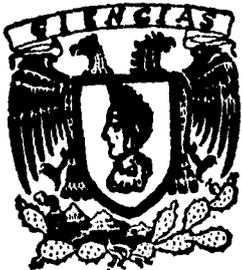
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ROBERTO BENITO PALMA CORTES



MEXICO, D. F.

1995

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

NOMBRE DE LA TESIS

**PRUEBAS ESTÁNDAR PARA
MATERIALES (METÁLICOS Y
CERÁMICOS)
POTENCIAMENTE
BIOCOMPATIBLES.**

Jurado asignado:

Presidente: Dra. María Cristina Piña Barba.

Vocal: Biol. Karina Torres Villaseñor.

Secretario: M. en C. María de los Angeles Aguilar Santamaría.

1er suplente: Dr. Gabriel Torres Villaseñor.

2do suplente: MVZ. Norina Pérez Gallardo.

**Trabajo desarrollado en el:
Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM.**

Asesor.

Dra. María Cristina Piña Barba.

Sustentante

Roberto Ilenito Palma Cortés

Agradecimientos:

A la Dra Cristina Piña por valioso apoyo y dirección para realizar este trabajo,

A la M. en C. Angeles Aguilar Santamaría por la revisión y la ayuda para este trabajo,

Al Dr. Gabriel Torres Villaseñor por sus comentarios para este trabajo,

Al Instituto de Investigaciones en Materiales en el cual se realizó la mayoría del trabajo,

A la Facultad de Ciencias por la formación dada,

A DGAPA por su ayuda económica para la realización de este trabajo,

A mis padres, por darme la vida, por su paciencia, por su apoyo incondicional para acabar mis estudios,

A mis Hermanos: David, Meli y Gabriel,

A Vero por su gran apoyo moral y confianza,

A la Sra. Blanca por su paciencia y consejos,

Índice

	Pag.
INTRODUCCIÓN.....	1
A) PRUEBAS "IN VITRO".....	11
PRUEBA ESTÁNDAR PARA LA EVALUACIÓN DE CULTIVO CELULAR EN CONTACTO DIRECTO CON MATERIALES PARA APARATOS MÉDICOS.....	12
PRUEBA ESTÁNDAR PARA PROBAR CITOTOXICIDAD EN CULTIVO CELULAR POR DIFUSIÓN EN AGAR.....	16
PRUEBA ESTÁNDAR PARA LA ESTIMACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD CELULAR Y DE TEJIDO PARA MATERIALES Y APARATOS PARA PRÓTESIS OROPACIAL.....	21
PRUEBAS ESTÁNDAR PARA ESTIMAR LAS PROPIEDADES HEMOLÍTICAS DE MATERIALES.....	34
B) PRUEBAS "IN VIVO".....	38
PRUEBA ESTÁNDAR PARA PROBAR BIOMATERIALES EN CONEJOS POR IRRITACIÓN PRIMARIA DE PIEL.....	39
PRUEBA ESTÁNDAR PARA PROBAR MATERIALES EN CUYOS POR CONTACTOS ALÉRGICOS.....	43
PRUEBA ESTÁNDAR PARA EVALUAR EXTRACTOS DE MATERIALES POR INYECCIÓN INTRACUTÁNEA EN CONEJOS.....	47
PRUEBA ESTÁNDAR PARA EVALUAR EXTRACTOS DE MATERIALES POR INYECCIÓN SISTÉMICA EN RATÓN.....	50
PRUEBA PARA PROBAR MATERIALES IMPLANTADOS EN UN PERIODO CORTO.....	54
PRUEBA ESTÁNDAR PARA LA ESTIMACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD DE BIOMATERIALES (NO POROSOS) PARA IMPLANTES QUIRÚRGICOS CON RESPECTO AL EFECTO SOBRE MÚSCULO Y HUESO.....	59
C) PRUEBAS FÍSICOQUÍMICAS AUXILIARES.....	65
PRUEBA ESTÁNDAR PARA EXTRACCIÓN DE PLÁSTICOS O MATERIALES MÉDICOS.....	66
PRUEBA ESTÁNDAR PARA LA PREPARACIÓN DE SUPERFICIES Y MARCADO DE IMPLANTES QUIRÚRGICOS METÁLICOS.....	69
PRUEBA ESTÁNDAR PARA CORROSIÓN (GRIETAS Y HOYOS) EN MATERIALES QUIRÚRGICOS METÁLICOS PARA IMPLANTES.....	72
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	81
GLOSARIO.....	85
BIBLIOGRAFÍA.....	89

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo el hombre ha tratado de sustituir partes de su cuerpo dañadas en accidentes o guerras, con materiales sintéticos, utilizando derivados de los polímeros, cerámicas y aleaciones metálicas, para sustituir hueso, ligamentos, o incluso corregir malformaciones congénitas etc.

En la segunda guerra mundial hubo la necesidad de utilizar materiales para ayudar, a soldados y a personas civiles que habían perdido un miembro durante las batallas.(1)

Muchos materiales no eran totalmente compatibles con el cuerpo humano, como algunos polivinilos, elastómeros, aleaciones (de acero), gomas de silicón, por lo cual se empezó a tratar de encontrar materiales biocompatibles que no produjeran reacciones tóxicas en el organismo.

Durante este siglo se ha desarrollado ampliamente la ciencia y la tecnología y han aportado grandes e importantes contribuciones a la medicina. La industria de materiales médicos se ha desarrollado ampliamente y, con ello, el surgimiento de las pruebas de seguridad para salvaguardar la salud de los pacientes se hizo necesario, debido principalmente a que a principios de siglo y durante la 1ª y 2ª guerras mundiales no hubo un control en el uso de estos materiales, ya que la filosofía de la industria durante décadas fue, la de colocar en el mercado el producto para incrementar las ventas, sin importar si el producto era o no aceptado por el paciente, por lo cual se incrementó el riesgo de toxicidad, ya que muchos de estos materiales no habían sido evaluados para uso en humanos.(1,2,3).

En la evaluación de la seguridad en el uso de biomateriales y aparatos médicos, han sido usados a menudo dos términos como sinónimos; "pruebas toxicológicas" y "pruebas de seguridad", sin embargo no significan lo mismo.

Las pruebas toxicológicas se refieren generalmente a un amplio grupo de pruebas, las cuales dan detalles o informes de la toxicidad de los productos (sustancias o materiales), aunque no vayan a ser usados como biomateriales. Por otra parte, las pruebas de seguridad son una serie de pruebas para demostrar que el producto o material es seguro para uso en humanos y que no provoca ningún daño, por ejemplo algún aparato o medicamento puede tener una traza biológicamente activa, elemento que en grandes cantidades puede ser tóxico, pero al usarse en pequeñas dosis no es perjudicial para el hospedero. Las pruebas toxicológicas forman parte de las pruebas de seguridad y a veces se sobreponen unas con otras. (1)

El primer país que tomó cartas en el asunto del riesgo en el uso de materiales en humanos, fue Estados Unidos y, en 1938, dió a conocer un acta, la "Food, Drug and Cosmetic Act", donde daba a la "Food and Drug Administration" (FDA) la autoridad para la acción reguladora contra el uso de aparatos, pero esta Acta sólo le permitía de revisar que los productos o materiales no estuvieran adulterados, limitando así, la acción de ésta.

La FDA se esforzó para ejercer acción legal, para someter a revisión los nuevos productos médicos que la tecnología desarrollaba, sus acciones fueron sometidas a un largo procedimiento legal.

En los años 50, la FDA fundó los laboratorios de "Material Science Toxicology" (MST) para desarrollar una serie de pruebas "in vivo" con animales e "in vitro" en cultivos

celulares, las cuales ayudarían a discriminar el agudo potencial tóxico de nuevos biomateriales, comparándolos con otros materiales.(1)

En los años 60 la FDA estableció que todas las pruebas deberían cumplir con ciertos requerimientos, como los siguientes:

- 1.- Los sistemas de prueba deben generar una amplia gama de respuestas biológicas en diferentes condiciones.
- 2.- Los resultados de las pruebas deben ser calificados y trasladados a un valor numérico que sería el valor acumulativo de toxicidad (CTI).
- 3.- Las pruebas deben ser bastante rápidas, para que un número grande de muestras pudieran ser evaluadas.
- 4.- Los protocolos y procesos de prueba deben ser suficientemente claros y sencillos para ser ejecutados por personal de otros laboratorios.
- 5.- Los resultados deben ser reproducibles no sólo por el grupo original que ideó la prueba sino por otros grupos.
- 6.- Los resultados de las pruebas deben ser fáciles de obtener, y comunicarlos de modo claro.
- 7.- Los resultados de las pruebas deben estar asociados con resultados clínicos en humanos.

En esta misma década la "Pharmaceutical Manufactures Association" (PMA), clasificó aparatos médicos de acuerdo con el uso que se les daba de la siguiente manera:

Tipo I.- Aparatos internos(Injertos, prótesis, etc.)

Tipo II.- Aparatos locales (agujas hipodérmicas, etc.)

Tipo III.- Aparatos indirectos(estetoscopios, aparatos para medir presión, vendajes, etc.)

Tipo IV.- Aparatos que no tienen contacto con los pacientes (lámparas, equipo electrónico, etc.)

Las razones para hacer esta clasificación se basaron en el empleo de diferentes pruebas de seguridad para cada tipo de aparato, ya que por ejemplo, los aparatos tipo I deben pasar pruebas de toxicidad y de seguridad más estrictas y detalladas que los aparatos tipo IV.

Ya a finales de los 60's, los problemas con aparatos médicos habfan crecido, se tenía conocimiento de algunos incidentes adversos en pacientes que usaban marcapasos y aparatos intrauterinos. En octubre de 1969, en un mensaje al Congreso de los Estados Unidos, se hizo un llamado para que hubiera una regulación federal de aparatos médicos, y no fue sino hasta 1976, que se promulgó la enmienda de sustancias y aparatos médicos, la cual le dió la autoridad a la FDA para someter a prueba a todas los aparatos médicos y sustancias que se usan en aplicaciones clínicas en humanos y creó una nueva clasificación de éstos, la cual sigue en vigencia y es la siguiente:

Clase I.- Aparatos y sustancias que requieren sólo controles generales.

Clase II.- Aparatos y sustancias que deben someterse a pruebas estándares de funcionamiento, y controles generales.

Clase III.- Aparatos y sustancias que requieren una estricta aprobación de mercado.(1)

La clase I son aparatos y sustancias de uso general con poco potencial para causar daño (vendajes, agujas hipodérmicas, etc.); la clase II, se refiere a todos los aparatos médicos.

los cuales dependiendo de su uso requieren diferentes niveles de prueba, y un control de calidad; la clase III se refieren principalmente a nuevas drogas y medicamentos;

Las pruebas a que son sometidos estos aparatos han sido creadas por diversas organizaciones, que ya llevan mucho tiempo repitiéndolas en diversos laboratorios, dando a estas pruebas el carácter de estándares. Las principales organizaciones que llevan acabo gufas de pruebas estándar están bajo el marco legal de la FDA, son las siguientes: "United States Pharmacopeia" (USP); "Pharmaceutical Manufactures Association" (PMA); "American Dental Association" (ADS); "American Society for the Testing of Materials" (ASTM); "Association for the Advancement of Medical Instrumentation" (AAMI).

El primer estándar aceptado oficialmente por la FDA fue elaborado por la USP en 1965, para probar un plástico utilizado para productos de maternidad, éste fue sometido a pruebas biológicas.(1)

Debido al desarrollo de estas pruebas diversos países comenzaron a preocuparse por el control en el uso de materiales médicos; principalmente los países europeos y Japón, que contaban con una gran tecnología, y empezaron a crear organizaciones para regular el uso de estos materiales, aunque al principio sólo las usaban para tener un control de calidad de los aparatos, sin tomar en cuenta la seguridad en los pacientes.(4)

Una de las principales organizaciones que tomó conciencia de esto fue la British Standard Institution, y tomando como referencia a la ASTM y a la USP, llevó a cabo una serie de pruebas, principalmente con conejos.(4)

A partir de mitad de los años 70 con el desarrollo de las pruebas estándares, y el incremento del uso de materiales médicos, hubo necesidad de definir nuevos conceptos, ya que en esta década el concepto de biomaterial y biocompatibilidad se fue usando con más frecuencia. Así, se puede decir que un biomaterial es un material que se requiere para ayudar en un tratamiento médico y que tiene contacto con tejidos de los pacientes por un período de tiempo. La biocompatibilidad se refiere a la interacción que tiene un biomaterial en un ambiente fisiológico, en el que está en contacto con tejidos y fluidos corporales, sin afectar adversamente este medio ambiente. El problema de la biocompatibilidad de los materiales, es el rechazo natural del cuerpo a cualquier material extraño que entre en él. (2,3,4,5)

Como puede verse el desarrollo de la ciencia de biomateriales ha sido un proceso largo, llevándose más de 30 años de discusiones, en institutos de investigación, congresos, sociedades, etc.

La ASTM es la asociación más conocida internacionalmente, cuenta con una serie de comités especializados que llevan a cabo pruebas estándares, estas pruebas son diseñadas, revisadas y renovadas cada año para los requerimientos estándar en diferentes áreas: Industria, Ingeniería, Física, Química, Medicina etc. Cada comité es designado con un letra mayúscula del alfabeto. Los estándares de la ASTM constan de 68 volúmenes, divididos en 16 secciones, cada sección dependiendo del área es realizada por uno o más comités, por esta razón las pruebas tienen una literal del comité y el número del estándar.

Este trabajo trata fundamentalmente de las pruebas biológicas más comunes que se deben aplicar a los materiales propuestos para ser implantados, y se complementan con algunas pruebas físico-químicas.

Todas estas pruebas son estándares internacionales aprobadas por la FDA y llevadas a cabo por la ASTM. Entendiendo por pruebas estándares internacionales aquéllas que

proporcionan un conocimiento científico sobre algún material para uso médico, repetitivo en el tiempo y en el espacio, caracterizando a éste desde cualquier punto de vista: físico, químico y biológico. Estas pruebas han sido realizadas y aprobadas en varios laboratorios del mundo, dándoles el carácter de internacionales.

Con el incremento del uso de los biomateriales en sus diversas aplicaciones, ha crecido la necesidad de proporcionar un mejor entendimiento de la biocompatibilidad, los métodos para estimar la biocompatibilidad han sido analizados minuciosamente por organizaciones especialistas en pruebas estándar, su interés está enfocado al funcionamiento de los diversos materiales en el medio ambiente fisiológico.

Las Principales pruebas biológicas que se llevan a cabo son de dos tipos:

a) "in vitro", las cuales implican el uso de las técnicas de cultivo celular (de células de animales extraídas de un donador y cepas ya establecidas), entre estas están: las pruebas de citotoxicidad, etc.

b) "in vivo" las cuales requieren el uso de animales de laboratorio (ratas, conejos, perros, etc.), como: las pruebas de irritación de piel, alergia, inyección sistémica, implantación, etc. (4)

Estas pruebas se complementa con otras pruebas fisicoquímicas específicas, como por ejemplo, la prueba de corrosión, la prueba de extracción, la prueba de terminado de superficie de implantes, etc.

La biocompatibilidad involucra las reacciones entre los biomateriales y los tejidos, ambos se afectan mutuamente, por lo cual el conocimiento de las ciencias físicas, químicas y biológicas se complementan.

La biocompatibilidad de los materiales usados en aparatos médicos sencillos o multicomponentes para uso humano depende en que parte del cuerpo se va a utilizar y para que fin, porque los tejidos reaccionan de manera diferente en función del tipo de material. Los métodos que se mencionan en este trabajo son aplicados en diferentes países del mundo, por eso se consideran estándares internacionales y son desarrollados y aplicados a materiales ya usados como prótesis, o para materiales potencialmente biocompatibles.

Cuando se usan nuevos materiales para aplicación médica en humanos, se hace un estudio bibliográfico para conocer las pruebas estándar más adecuadas que se les deben aplicar, para asegurarnos que no produzcan una respuesta biológica adversa que perjudique al ser humano y el beneficio del aparato en el cual se usa el material.

Las pruebas estándar son aplicadas a los materiales a veces sin un orden específico, o sea cuál de las pruebas primero o cuál después, pero también es cierto que entre más pruebas se apliquen a un material estará mejor caracterizado(60), tanto fisicoquímicamente como biológicamente y se podrá obtener así, una información más detallada de la biocompatibilidad y compararla con las características que debe tener un material para ser considerado biomaterial, como son:

1. Ser compatible bioquímicamente, no ser tóxico, no ser irritante, no ser alergénico, ni carcinogénico.
- 2.- Además de ser físicamente compatible, es decir, debe contar con una estructura mecánica que armonice con el tejido donde será implantado.
3. Ser bio-adhesivo, o sea que se adhiera al tejido vivo. (59)

Para conocer la biofuncionalidad de un material son necesarias el conocimiento y la aplicación de las pruebas estándar de biocompatibilidad por tres razones:

1. Desarrollan el conocimiento y la investigación de materiales potencialmente biocompatibles o prueban los materiales ya usados como prótesis, para saber su funcionalidad a nivel clínico.
2. Las pruebas pueden ofrecer información para regular el uso de materiales y aparatos médicos para uso en humanos.
3. Las pruebas de biocompatibilidad se aplican, para medir el grado de biocompatibilidad de materiales. (59)

El estudio de la biocompatibilidad, es un campo relativamente nuevo, en el cual las aportaciones de las investigaciones son valiosas, el desarrollo de la pruebas tendientes a este conocimiento se han ido modificando grandemente con el tiempo y se han tomado experiencias de las aplicaciones de éstas en otros laboratorios para complementarlas. A través de la investigación bibliográfica se encontró que el área de la biocompatibilidad de materiales es un campo relativamente nuevo y las pruebas que se presentan en este trabajo tienen hasta hoy una aplicación general en todos los países que han tenido un avance significativo en esta rama, como Estados Unidos, Inglaterra, Suiza, etc.

Estas pruebas pueden ser aplicadas en países donde no exista un reglamento que especifique que todos los aparatos médicos que tengan contacto con el cuerpo humano sean sometidos a prueba independientemente de si son utilizados internamente o externamente. (36)

En general, las pruebas de biocompatibilidad incluyen pruebas para cada tipo de materiales, porosos, no porosos, biodegradables y extractos de éstos, dependiendo de la naturaleza de la aplicación y uso final del material o aparato. (4)

Estas pruebas al aplicarse en México se pueden modificar de acuerdo a las condiciones del trabajo de investigación como son: el presupuesto y la infraestructura con la cual se cuenta, principalmente debido a los costos de los diferentes métodos, así como el modelo experimental que se emplee.

En el Instituto de Investigaciones en Materiales (IIMUNAM) se han propuesto materiales para su uso como implantes ortopédicos, por lo que es necesario conocer y más tarde instrumentar, las pruebas a las que se deben someter estos materiales.

Estas pruebas se tomaron como referencia, ya que en México no existen pruebas de este tipo y además no existe hasta el momento de iniciarse este trabajo una legislación que regule la seguridad en el uso de materiales para aplicaciones médicas.

El objetivo de este trabajo es recomendar suficientes pruebas biológicas para establecer un nivel razonable de confianza concerniente a la respuesta biológica de un material o aparato. (22,23,35)

En este trabajo se recomiendan métodos de pruebas biológicas, para probar la biocompatibilidad de materiales y aparatos que se intentan usar en humanos, como prótesis, rellenos óseos, etc.

En la bibliografía, se encontraron varias organizaciones internacionales dedicadas a la estandarización de pruebas para la biocompatibilidad de materiales, pero muchas de éstas, tienen base en la ASTM, por lo cual se tomó como referencia a esta organización.

Las pruebas tomadas como referencia son de dos tipos: pruebas "in vitro" y pruebas "in vivo", además se incluyen tres pruebas físicoquímicas, que son de gran ayuda para las

pruebas biológicas, y que se deben llevar a cabo antes que éstas. Las pruebas biológicas se mencionan en un orden, el cual nos parece el más lógico para una mejor caracterización y estudio de los materiales, por que en este orden se analiza el material a probar primero "in vitro" para estar seguros de que no tenga efectos tóxicos y de esta forma evitar probarlos "in vivo" y sacrificar animales inútilmente, aún así, si el material llega a pasar las pruebas "in vitro", y al aplicarle las pruebas "in vivo" resulta ser irritante o alergénico, se pueden evitar las pruebas de implante evitando también el sacrificio de más animales.

Las pruebas biológicas que se mencionan en este trabajo estan divididas en dos :

A) "*in vitro*" las cual incluyen las siguientes:

a) Pruebas de citotoxicidad en cultivo celular: Esta prueba evalúa "in vitro" la toxicidad de materiales ya sea en polvo, películas o extractos, los cuales se aplican a un cultivo celular. Tres pruebas se han incluido en este trabajo: difusión en agar, cultivo celular en contacto directo con el material, y citotoxicidad en cultivo de células de la región orofacial. Todas estas pruebas estiman la toxicidad de cada uno de los substratos de materiales o extractos de solución para cultivo celular. El daño celular es observado y comparado con controles positivos y negativos. (40,41, 43)

b) Hemólisis: Esta evalúa qué materiales provocan lisis de los eritrocitos "in vitro", midiendo la cantidad de hemoglobina liberada en el plasma. Las varillas de prueba y extractos de materiales son incubados con sangre humana o de conejo en tubos de prueba dinámicos y estáticos. La cantidad de plasma y hemoglobina es medida y comparada tanto para materiales de prueba como de control. (38, 44, 50)

B) "*in vivo*" Las cuales incluyen las siguientes:

Previamente antes de llevar a cabo las pruebas de irritación de piel, de alergia e inyección sistémica se debe llevar a cabo la prueba auxiliar de

Extracción: ésta se basa en el fenómeno de lixiviación, que se lleva a cabo utilizando líquidos que simulen fluidos corporales como: sueros fisiológicos, aceites vegetales, etc., éstos líquidos pueden llegar a extraer sólidos tóxicos que se encuentran en la superficie de los materiales (metálicos y polímeros), una vez hecho la extracción o lixiviación, los extractos líquidos se utilizan en las pruebas "in vivo" de inyección intracutánea, inyección sistémica, irritación, también se pueden utilizar en los cultivos celulares. (13,14,15,16, 18, 17, 27)

a) Prueba de irritación de piel: Esta prueba es recomendada en la piel de conejo, los materiales se colocan en la piel de conejos en forma de parche para evaluar si es o no irritante, después de 24 horas los parches son removidos, y la piel es calificada por eritema o edema. (32)

b) Prueba de alergia: Esta evalúa qué tan alergénico es un material, es un procedimiento de prueba por medio del cual el material, o polvos de éste son mezclados con un

complemento (coadyuvante de Freud) y administrado a la piel de los puercos de guinea durante dos semanas, que es el periodo de inducción. Después de dos semanas los puercos de Guinea son calificados si se observa reacción alérgica de su piel (edema y eritema) durante 24 horas. (33)

c) Prueba de inyección intracutánea (irritación): Esta prueba evalúa qué tan irritantes son los productos de lixiviación de un material. Esta prueba está diseñada para determinar la respuesta biológica de conejos, para una dosis sencilla de inyección intracutánea de una solución blanco (de control) y extractos preparados de las muestras de prueba. Todos los conejos son observados para determinar si tienen señales de eritema (enrojecimiento de la piel), y edema (inflamación de la piel), en el sitio de la inyección por períodos de más de 72 horas. Las reacciones significativas son registradas y los extractos de prueba son clasificados. (36)

d) Prueba de inyección sistémica (toxicidad aguda): Esta prueba evalúa la toxicidad de los productos de lixiviación de un material. Esta prueba está diseñada para determinar la respuesta biológica de animales (ratas, conejos, etc.) para la dosis de inyección intravenosa o intraperitoneal de extractos, los cuales son preparados del material a probar, por medio de la prueba química de extracción. Los medios de extracción preferidos son salinos, aceites vegetales y otros líquidos simulando fluidos corporales. Todas las ratas son observadas para ver si tienen signos de toxicidad inmediatamente después de la inyección y de nuevo a intervalos especificados. (37)

Antes de las pruebas de implantación de deben llevar a cabo las siguientes pruebas fisicoquímicas (principalmente para metales):

Prueba de Corrosión: en esta prueba nuestro material candidato es sumergido en una solución fisiológica dentro de una celda de corrosión, por medio de un potencioestato se le estimula con un potencial eléctrico, con la ayuda de un electrodo de referencia se mide la diferencia de potencial en diferentes tiempos para conocer a que potencial y a que tiempo se crean grietas u hoyos de corrosión; de esta forma se clasifica si es o no resistente a la corrosión. Estos datos nos ayudan para conocer si el material dentro del sitio de implante dentro del cuerpo humano puede o no degradarse debido a la corrosión y de esta forma afectar la biocompatibilidad y la biomecánica. (9,10,11,34, 44, 51, 52)

Prueba de terminado de superficie para implantes: La biocompatibilidad de los materiales es dada también por las características físicas de su superficie, por eso se recomienda en esta prueba pulirlas a espejo por medio de lijas de 600 y alumina de 3 μm , después formarles una capa llamada de pasivación sumergiéndolas en un ácido fuerte diluido, posteriormente también se recomiendan diferentes tipos de marcados para los implantes. (6, 8, 25)

e) Prueba de implantación intramuscular o de periodo corto: Este tipo de prueba está diseñado para evaluar la reacción del tejido vivo con una muestra del material que será implantado quirúrgicamente en un tejido animal (conejo, ratón, perro). Al final del período

de prueba, los sitios de implantación serán examinados por el tipo y grado de reacción del tejido, y el material de prueba es clasificado con base en estas reacciones. También sirve para evaluar la movilidad de implantes y tejidos en los planos subcutáneos, estos sitios son significativamente diferentes a otros sitios de implantación, por eso es importante considerar la reacción de esta área de tejido para implantes y materiales. (39)

f) Prueba de implante por un período largo: Esta prueba involucra la implantación de metales, plásticos y cerámicas, por un período largo en músculo y hueso, al final de los diferentes periodos se analizan los sitios de implante para determinar el grado de reacción del tejido. (42, 53, 54)

A continuación se menciona una lista de aparatos médicos clasificados dependiendo de su uso y aplicación:

Aparatos externos, son aquellos que sólo tienen contacto con superficies externas del cuerpo, como: electrodos, tablillas, prótesis externas, vendajes de varios tipos, material de curación, aparatos óseos etc.

Aparatos que comunican externamente como:

a) Los que comunican con canales naturales, por ejemplo: lentes de contacto, catéteres urinarios, aparatos intraintraestinales (sigmoidoscopios, colonoscopios, tubos estomacales gastroscopios), tubos endotraqueales, broncoscopios y algunas partes de equipo auxiliar que están en contacto con materiales internos del cuerpo o irrigación instalada.

b) Los intraoperativos: que se emplean cuando se lleva un proceso activo en pocas horas; los ejemplos incluyen: agujas hipodérmicas, electrodos penetrantes, instrumentos de biopsia, artroscopios, equipo de irrigación, instrumentos quirúrgicos, y algunas partes de equipo auxiliar que están en contacto con tejidos internos del cuerpo, por un:

b') Período corto (menos de treinta días), estos incluyen: aparatos de perfusión, aparatos de drenaje, aparatos de estabilización ortopédica, algunas partes de equipo auxiliar que están en contacto con material interno del cuerpo.

b'') Período crónico (más de treinta días), ejemplos: electrodos percutáneos, electrodos penetrantes activos, alambres de Kirschner, alfileres Steinman, prótesis estapedotómicas, prótesis de reemplazamiento oscilar parcial o total, o tubos de ventilación taponoplástica.

Aparatos que tienen contacto con sangre:

a) Aparatos que ayudan a establecer una trayectoria de sangre indirecta: productos que hacen contacto con la sangre en un punto usualmente por 24 horas y sirven como un conductor para corriente de fluido en el sistema vascular. ejemplos: administración de soluciones, transfusiones, o administración de sangre.

b) Aparatos usados para establecer un contacto directo con la trayectoria de la sangre por un periodo corto. Exposición sencilla de recirculación de sangre o un producto que generalmente está en la trayectoria de la sangre menos de 24 horas, ejemplos: catéteres intravenosos, oxigenadores, tubo oxigenador extracorporeal y accesorios.

c) Aparatos usados para establecer un contacto directo con la trayectoria de sangre por un período largo. Exposición crónica, ejemplos: dializadores, tubos de diálisis y accesorios.

Aparatos implantados por un período largo:

a) En contacto principalmente con hueso, ejemplos: alfileres ortopédicos, placas atornilladas, reemplazo de articulaciones, prótesis de hueso, cementos o implantes dentales. (49)

b) Aparatos en contacto principalmente con tejidos y fluidos, ejemplos: marcapasos, aparatos que administran medicamentos, sensores neuromusculares y estimuladores, reemplazamiento de tendones, faciales, pechos y otros implantes, tubos de fluidos cerebroespinales, laringes artificiales, válvulas de vasos deferentes o pinzas de ligación.

c) Aparatos que están en contacto principalmente con sangre, como: electro-marcapasos, venas artificiales, válvulas del corazón, injertos vasculares, monitores de sangre, catéteres de distribución interna de drogas o bombas ventriculares auxiliares.

El cuadro siguiente enlista los métodos de pruebas biológicas para materiales o aparatos, incluyendo sus aplicaciones; la posición de la serie y la intersección de columna se marca para indicar si la prueba se recomienda para un material o un aparato, o para la aplicación específica indicada. Este cuadro sirve para conocer de acuerdo al tipo de material y su aplicación qué prueba de biocompatibilidad se debe de usar.

En la siguiente sección expongo las pruebas, a que deben ser sometidos todos los materiales potencialmente biocompatibles o los que ya han sido aceptados como biomateriales para uso clínico en humanos.

Clasificaciones de Materiales o Aparatos y Aplicaciones	Pruebas Aplicables												
	Citotoxicidad cultivo celular	Irritación Cutánea	Implantación Intramuscular	Hemólisis	Compatibilidad Sanguínea	Carcinogenicidad	Implantación Periodo Largo	Irritación de Membranas Mucosa	Toxicidad Aguda Inyección Sistemática	Inyección Intracutánea (Irritación)	Sensibilización (Alergia)	Mutagenicidad	Pruebas de Progenicidad
Aparatos Estrechos (5.2):													
Superficies intactas		X									X		
Superficies	X	X							X	X	X		
Aparatos que comunican (5.3) externamente con:													
Canales Naturales intactos													
Interoportivos								X			X		
Periodo Corto	X							X			X		
Crónico	X		X					X	X	X	X		
Fluidos y tejidos corporales													
Interoportivos	X							X	X	X			X
Periodo Corto	X		X					X	X	X			X
Crónico	X		X					X	X	X	X		X
Vía sangre indirecta			X	X	X			X	X	X	X		X
Vía sangre directa periodo corto			X	X	X			X	X	X	X		X
Vía sangre directa periodo largo			X	X	X			X	X	X	X		X
Aparatos implantados (5.4) contactando principalmente con:													
Huano	X					X	X		X		X	X	X
Tejido y fluidos	X		X			X	X		X	X	X	X	X
Sangre	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X

Fig.1 Tabla de Aparatos y sus Aplicaciones y Procedimientos de Prueba Aplicables para la Biocompatibilidad tomada de la referencia (35)

A) PRUEBAS " IN VITRO "

PRUEBA ESTÁNDAR PARA LA EVALUACIÓN DEL CULTIVO CELULAR EN CONTACTO DIRECTO CON MATERIALES PARA APARATOS MÉDICOS. (40)

INTRODUCCIÓN

Esta práctica proporciona un método de cultivo celular para predecir el potencial citotóxico de materiales que se usan en la construcción de aparatos y materiales médicos. En general los métodos de prueba de cultivo celular han demostrado una buena correlación con las pruebas en animales y son frecuentemente más sensibles para pequeñas cantidades de tóxicos, además de que son métodos rápidos.

Los aparatos médicos como los implantes o ciertos aparatos que se proponen para un contacto íntimo con órganos no deben producir reacciones biológicas adversas, por eso esta prueba puede usarse como una referencia para otro tipo de pruebas de citotoxicidad, como la prueba de difusión en agar y como parte de un programa de control de calidad para probar y establecer aparatos y materiales médicos.

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

Se propone la línea celular L-929 de tejido conjuntivo de ratón para el método de prueba, porque tiene una historia relevante en las pruebas de este tipo. Esto no implica que su uso sea preferencial; sólo que la línea L-929 es una línea celular establecida, bien caracterizada, disponible y que ha proporcionado resultados reproducibles en varios laboratorios. (40, 56)

El cultivo celular se deja crecer hasta formar una monocapa confluyente en cajas de petri. El medio de crecimiento es aspirado y reemplazado para proporcionar un descanso a la capa celular confluyente. Las muestras de prueba (material a evaluar o probar) y de control son colocadas en contacto directo con la capa celular para proporcionar una estimación rápida de la presencia o ausencia de un efecto citotóxico de un material o aparato dado.

Se evalúa la reacción del material de prueba usando como referencia las reacciones que producen los materiales de control, tanto positivos como negativos y con base en esto, se decide si el material de prueba es citotóxico o no. Los resultados son considerados válidos sólo cuando las respuestas esperadas para ambos controles son obtenidas y el material de prueba se compara con ambos y se observa si las reacciones que produjo éste son parecidas al control positivo o negativo, si son parecidas al control positivo el material puede ser tóxico, si son parecidas al control negativo el material no es tóxico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras:

- Esterilice todas las muestras por un método apropiado, ya sea por calor, radiación UV, etc.

Materiales de control:

- Prepare muestras de control negativo de un material que no provoque una respuesta celular adversa por ejemplo, el estándar de referencia de plástico de control negativo (polietileno de ultrapeso molecular) de la USP.(57)
- Prepare muestras de control positivo de un material que provoque un predecible, y moderado grado de citotoxicidad. Puede usar fenol acuoso (0.45 ± 0.05 % por volumen) para producir una reacción de degeneración y desprendimiento celular o la goma de látex por ejemplo, cortada de un catéter de Foley.
- Corte los materiales de prueba de aparatos médicos sólidos grandes en secciones transversales para obtener una superficie plana con una área de 100 a 250 mm² y para colocarlos en contacto directo con la monocapa celular.
- Prepare muestras de aparatos médicos que tengan forma de varilla o tubo como sigue:
 - Cuando el diámetro es menor de 6.4 mm, cortar secciones de 5 a 15 mm de longitud.
 - Cuando el diámetro es de 6.4 a 15 mm, cortar secciones de 2 a 8 mm de longitud.
 - Cuando el diámetro excede los 15 mm, prepare secciones transversales a partir de sitios con secciones relativamente largas para exponer el material interior.
- Si un aparato es construido con dos o más materiales, cortar cada una de las muestras de prueba de la interface de los materiales o muestras separadas de prueba de cada material.
- Las muestras de extractos o líquidos para evaluar citotoxicidad se filtran, una vez saturado el papel filtro esterilizado, permita que el exceso de líquido drene mientras se mantiene la asepsia. Use el filtro de disco saturado como muestra de prueba.
- Cuando se usa el óxido de etileno u otros químicos parecidos como esterilizante, debe dejarse un tiempo adecuado de aireación, para permitir la disipación de residuos los cuales pueden tener efectos adversos en los resultados de esta prueba.
- En general, las muestras deben ser limpiadas y esterilizadas para remover algún residuo que haya quedado después que han sido cortadas a la medida.
- La medida y la forma de las muestras de prueba pueden variar considerablemente, por tal motivo trate de proporcionar físicamente su ensamble en la caja de petri.

Preparación de la capa celular:

Prepare los medios y las monocapas celulares como sigue:

- Prepare el medio esencial mínimo (MEM), suplementado con sales de Earle y 10% de suero fetal bovino, inmediatamente antes de su uso; 1 ml de solución de L- glutamina, son añadidos a cada 100 ml de MEM, también añada 100 unidades de penicilina por mililitro de medio y 100 µg de estreptomycin/ml de medio. Abiertos los recipientes de MEM pueden ser almacenados a una temperatura de 2 a 8 °C por periodos de no más de una semana.
- Solución de L glutamina, 29.2mg/ml de agua estéril.

- Solución de Hanks, libre de calcio y magnesio (almacenar en cuarto de temperatura).
- Solución de tripsina al 1 % en solución de Hanks libre de calcio y magnesio o buffer salino de fosfato (almacenar en congelador).
- aspire el medio de un frasco de cultivo con 150 cm² de cultivo celular conteniendo una monocapa celular casi confluyente.
- Enjuague las células con 5 ± 0.5 ml de solución de Hanks.
- Aspirar la solución de enjuague.
- Añada 5 ± 0.5 ml de la solución de tripsina (al 0.1 %) al matraz.
- Incube por 5 a 10 min para suspender las células.
- Transfiera la suspensión celular a un tubo de centrifuga.
- Centrifugue a 1300 g por 6 min.
- Descarte el sobrenadante.
- Resuspenda las células en 10 ± 0.1 ml de medio fresco, mezclando la suspensión totalmente.
- Añada 2 ± 0.1 ml de medio a cada caja de petri.
- Usando una pipeta serológica estéril de 10 ml, añadir 5 a 7 gotas de la suspensión celular a cada caja.
- Incube hasta tener formada una monocapa cercanamente confluyente, que se observa por examinación microscópica.
- La formación de una monocapa casi confluyente usualmente requiere de 3 a 5 días. El tiempo requerido para la formación de una monocapa puede ser regulado de acuerdo a la concentración celular que se coloque en el medio, por que una concentración celular de 1.3×10^6 células/ml daría un tiempo consistente de 24 hr. Debe reconocerse que este procedimiento puede incrementar el riesgo de contaminación bacteriana. (40, 55, 58)
- Si la suspensión celular permanece sin usar, un subcultivo puede ser preparado al añadir 9 ml de medio fresco por cada ml de cada suspensión en un frasco de cultivo celular con una superficie de área de aproximadamente 3 cm² por cada ml de células diluidas e incubadas hasta tener formada una monocapa celular casi confluyente.

Procedimiento de prueba

Ejecute la prueba de citotoxicidad por contacto directo como sigue:

- Examine al microscopio los cultivos celulares y rechace alguno en el cual la monocapa celular no sea correctamente confluyente o las células muestren signos de granulación o desprendimiento.
- Aspirar el medio de todos los cultivos aceptables y reemplace éste con 1.5 a 2 ml de medio fresco.
- Coloque una muestra de control o de prueba en cada caja en contacto directo con la monocapa celular. Prepare duplicados de cultivos para cada material de prueba, tanto para controles positivos como negativos.
- La baja densidad de los materiales que tiendan a flotar en el medio puede estar apoyado en contacto con la monocapa celular al colocar una pieza de control negativo encima de éste para que baje.
- Incube todos los cultivos por 24 ± 1 hr a 37 °C, con CO₂ al 5%.
- Examine cada cultivo microscópicamente.

- El uso de una tinción histológica tal como el violeta cristal al 2 % en etanol al 20 % puede ser útil en la observación de los cultivos.

Evaluación de los resultados

- El cultivo celular se debe examinar en busca de un efecto citotóxico si al microscopio revela lo siguiente:

a) Si la malformación, la degeneración, el desprendimiento, o la lisis de las células se extiende más allá del perímetro de la muestra de material; o

b) Una reducción moderada del 20% o severa mas del 50% de la densidad de la capa celular.

c) Una reducción leve menor del 20% de la densidad de la capa celular es aceptable, con tal de que no haya evidencia de las condiciones especificadas arriba.

- Si, para una serie dada de muestras, un efecto citotóxico es observado para los controles negativos o no es provocado un efecto citotóxico por el control positivo, los resultados para esta serie de muestras deben considerarse inválidos.

- Si ninguna muestra de un material de prueba provoca un efecto citotóxico como se describe arriba, el material debe ser considerado para pasar esta prueba.

- Si las muestras de un material de prueba provocan un efecto citotóxico, el material debe ser considerado como fallo para esta prueba.

- Si sólo una muestra del material de prueba provoca un efecto citotóxico, la prueba debe ser repetida. El material debe ser considerado para pasar esta prueba sólo si ninguna de las muestras restantes provocan un efecto citotóxico, de otra manera, este debe ser considerado fallo.

REPORTE

- El reporte de los resultados de la prueba debe tener como mínimo lo siguiente:
- Fecha de la prueba.
- Cepa celular usada.
- Historia del cultivo de células.
- Medio usado (anotando si fueron usados antibióticos)
- Descripción de todas las muestras de control y de prueba incluyendo:
- Nombre del material o aparato
- Número de lote u hornada.
- Fuente de suministro.
- La medida y el método de preparación.
- El método de esterilización.
- El informe de que cada material de prueba pasó o falló la prueba, esto de acuerdo a las comparaciones hechas con las muestras de control positivo y negativo. Dando los porcentajes de la lisis para cada muestra.
- Alguna otra observación pertinente, incluyendo algunas desviaciones o modificaciones del método exacto descrito aquí.

PRUEBA ESTÁNDAR PARA PROBAR CITOTOXICIDAD EN CULTIVO CELULAR POR DIFUSIÓN EN AGAR. (41)

INTRODUCCIÓN

Este método de prueba es apropiado para materiales que tengan varias formas y en situaciones donde la cantidad de material es limitado, por ejemplo; aparatos pequeños o polvos los cuales son colocados sobre el agar y es examinada la presencia de una zona de inhibición del crecimiento celular.

Este método de prueba no es apropiado para las trazas que no difunden en el agar o agarosa. La capa de agar actúa como amortiguador para proteger las células de la muestra, pero no son apropiados para este método los materiales que son muy pesados y comprimen el agar y no difunden o causan daño mecánico a las células.

La línea celular L-929 fue elegida por que tiene una historia relevante de uso en pruebas de este tipo. Esto no implica que su uso es preferido, sólo que es una línea celular establecida, bien caracterizada y fácilmente disponible, que ha demostrado resultados reproducibles en varios laboratorios. (41, 56)

Este método de prueba es útil para la estimación del potencial citotóxico de nuevos materiales, y como parte de un programa de control de calidad para establecer componentes y aparatos médicos; por que la estimación de la citotoxicidad proporciona información útil para ayudar en la predicción de las aplicaciones clínicas potenciales en humanos. Los métodos de cultivo celular han demostrado buena correlación con pruebas de animales y son frecuentemente más sensibles a agentes citotóxicos.

Este método de cultivo celular es adecuado por la incorporación dentro de especificaciones y estándares para materiales que se utilizan en la construcción de aparatos médicos para ser implantados en el cuerpo humano o colocados en contacto con los fluidos de tejidos o sangre por un periodo largo.

Algunos biomateriales con una historia de uso clínico general y que se suponen son seguros pueden ser citotóxicos. Este método de prueba no implica que todos los biomateriales puedan pasar esta prueba para ser considerados seguros para su uso clínico.

Los métodos de laboratorio de cultivo celular proporcionan un método rápido para la estimación del potencial citotóxico de aparatos médicos y de materiales utilizados en su construcción. El método de difusión de agar es una de las varias técnicas que son comúnmente usadas. El método de cultivo celular descrito en este estándar es una modificación de los métodos que han sido rutinariamente usados por más de 10 años.

RESUMEN DE LA PRUEBA

Se evalúa la reacción del material de prueba usando como referencia las reacciones que producen los materiales de control, tanto positivo como negativo y con base en esto, se decide si un material es citotóxico o no. Los resultados son considerados válidos sólo cuando las respuestas esperadas para ambos controles son obtenidas y comparadas con el de prueba.

Los cultivos celulares crecen hasta una monocapa confluyente en las cajas de cultivo. El medio es aspirado y reemplazado con un medio conteniendo agar, el cual se deja

solidificar. Los materiales de control y de prueba son colocados en la superficie del agar para evaluar las propiedades citotóxicas de un material o aparato dado. Los componentes tóxicos del material de prueba pueden difundirse en el medio de cultivo, formando un gradiente de concentración y afectando adversamente a las células a alrededor de éste. Este método está bien adaptado para materiales de baja densidad (en forma de películas, polvos, líquidos, etc.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de prueba y de control:

Para las características de los materiales de prueba y de control; siga las mismas indicaciones de la prueba estándar para la evaluación del cultivo celular en contacto directo con materiales para aparatos médicos, o consulte las referencias 40 y 41.

Preparación de medios y Mantenimiento del cultivo celular

- Para mantener el cultivo celular, el medio 1X es preparado al mezclar 90 ml de MEM de Eagle con sales de Earle, sin L-glutamina, ajustando la solución al pH 7.15, añadir 1 ml de aminoácidos no esenciales 100X (L-glutamina) a cada 100 ml de MEM antes de colocarlo en el cultivo, también añada 100 unidades de penicilina/ml de medio y 100 mg de estreptomicina/ml de medio.

- Solución de L glutamina, 29.2mg/ml de agua estéril.

- Solución de Hanks, calcio y magnesio libre (almacenar en cuarto de temperatura).

- Solución de tripsina al 1 % en solución de Hanks o calcio y magnesio libres, y buffer salino de fosfato (almacenar en congelador).

Use los siguientes procedimientos para mantener las células por subcultivo serial

- Aspire el medio de un frasco de cultivo celular de 150 cm² que contenga una monocapa casi confluyente de cualquiera de los clones de la cepa 929 ATCC, CCL 1 NCTC (clon de la cepa L, de tejido conectivo de ratón) designada L-929.

- Enjuague las células con suficiente solución de Hanks balanceada de sales para remover residuos de suero (por ejemplo, 5 a 10 ml).

- Aspire la solución de enjuague.

- Añada al frasco de cultivo hasta cubrir la monocapa celular aproximadamente 5 ml de una solución de tripsina (al 0.1 % en solución de sales balanceada de Hanks almacenar en frío).

- Incubar de 5 a 10 min para suspender las células.

- Transferir la suspensión celular a un tubo de centrifuga.

- Centrifugue a 1300 g por 6 min.

- Descarte el sobrenadante.

- Resuspenda las células en 10 ± 0.1 ml de medio fresco y mezclar la suspensión a fondo.

- Distribuya la suspensión celular equitativamente entre 2 a 8 frascos de cultivo de tejidos de 150 cm².

- Añadir un volumen suficiente de medio fresco para que cada frasco contenga 50 ml aproximadamente.

- Cambie el medio cada 2 o 3 días hasta que la monocapa sea casi confluyente.

Preparación de la capa celular

- Prepare la monocapa celular confluyente como sigue:
- Añada 2.0 ± 0.1 ml de medio a cada caja de petri.
- Use una pipeta serológica estéril de 10 ml, añada de 5 a 7 gotas de la suspensión celular (descrita arriba) a cada caja. Gire las cajas para asegurar una distribución uniforme de células.
- Incubar hasta que se haya formado una monocapa casi confluyente, que es observada microscópicamente.
- Si la suspensión celular permanece sin usar después del paso, un subcultivo puede ser preparado al añadir 9 ml de medio fresco por cada ml de suspensión en un frasco de cultivo celular de aproximadamente 3 cm² por cada ml de células diluidas e incubadas hasta que se haya formado una monocapa casi confluyente, que se determina microscópicamente.

Procedimiento para la prueba de citotoxicidad

- Lleve a cabo la prueba de citotoxicidad por difusión en agar como sigue:
- Examine microscópicamente los cultivos celulares y rechace alguno en donde la monocapa celular no sea correctamente confluyente o las células muestren signos de granulación o desprendimiento.
- Meta al autoclave el agar al 3 % por 15 min a 121 °C.
- Coloque el agar esterilizado en un baño maría a 45°C y deje que se enfríe a 45°C.
- Para preparar la capa de agar; mezcle 20 ml de MEM de Eagle 10X (con sales de Earle, sin L-glutamina), 0.22 gr de bicarbonato de sodio (buffer) y agua destilada estéril hasta llevar el volumen al 70 % (70ml). Ajustar el pH hasta 7.15. Añadir 20 ml de suero fetal bovino y 2 ml de aminoácido no esencial 100X (L-glutamina). Llevar hasta el volumen final (100 ml) con agua destilada estéril, filtre para esterilizar el medio 2X.
- Coloque MEM 2X en un baño maría a 45°C y deje que se entibie a 45°C. No deje que el medio permanezca en 45°C por más de una hora.
- Mezcle volúmenes iguales de MEM 2X y agar nobel al 3 % a fondo. Deje que la mezcla se enfríe aproximadamente hasta 39°C.
- aspire el medio de todos los cultivos aceptables, y reemplace éste con 2.0 ml de medio de agar.
- Coloque las cajas de cultivos a 37° C sobre una superficie plana para que solidifique el medio.
- Coloque una muestra de prueba sencilla o de control en cada caja en contacto con la superficie del agar. Prepare duplicados de cultivos para cada material de prueba, tanto para controles positivos como negativos.
- Este método puede ser modificado usando cajas grandes de cultivo para acomodar así las muestras de control positivo y control negativo en la misma caja, como las muestras de prueba. Las cuantificaciones de células y reactivos pueden ser incrementadas apropiadamente si se usan cajas grandes.
- Incube todos los cultivos por 24 ± 1 hr a 37 °C y 5 % de CO₂.
- Marque el contorno de las muestra en la parte baja de la caja de cultivo con un marcador permanente, luego remueva la muestra.

- Añada 2 ml de una solución de rojo neutro al 0.01 % por peso en el buffer salino de fosfatos e incube por una hora, y examine cada cultivo microscópicamente sobre y alrededor de cada muestra de prueba y de control.

Evaluación de los resultados

- Las mediciones del índice de zona se realiza donde están las células que no se tiñeron con rojo neutro. Tabla 1
- Las medidas del índice de lisis es el número de células afectadas dentro de la zona de toxicidad. El cultivo celular debe ser observado para ver si hubo o no un efecto citotóxico, es decir; si el examen microscópico revela malformaciones, degeneración, desprendimiento o lisis de las células dentro de la zona; o una reducción moderada o severa en la densidad de la capa celular. Tabla 2
- Una reducción escasa de la densidad de la capa celular es aceptable, con tal de que no haya otra evidencia de la citotoxicidad como se especifica arriba.
- El índice de respuesta puede ser determinado por la razón del índice de zona y el índice de lisis para cada muestra ($RI = ZI/LI$).

$$\text{Índice de respuesta} = \frac{\text{Índice de zona (0-5)}}{\text{Índice de lisis (0-5)}}$$

El índice de respuesta debe ser reportado como una fracción por ejemplo 3/2. Un índice no citotóxico debe ser menor a 1, un índice citotóxico es mayor a 1. (41).

- Si, para una serie dada de muestras, se observa un efecto citotóxico para los controles negativos o el efecto citotóxico no es provocado por los controles positivos, los resultados para esta serie de muestras deben de ser invalidados.

REPORTE

- El reporte de los resultados de la prueba debe de incluir, pero no estar limitados a la siguiente información:
- Fecha de la prueba.
- Cepa celular usada.
- Medio usado (anotando si se usaron antibióticos).
- Una descripción de las muestras de control y de prueba, incluyendo:
- Nombre del aparato o material (Incluyendo número de especificación de la ASTM apropiada).
- Número de grupo o lote
- Fuente de suministro.
- Medida y método de preparación.
- Método de esterilización.
- Valores numéricos para el índice de zona, índice de lisis, e índice de respuesta.
- Alguna otra observación pertinente, incluyendo alguna modificación del método exacto descrito aquí.

Tabla 1 Descripción de la zona de reacción. (41)

Índice de Zona	Descripción de la zona
0	No se detecta la zona ni alrededor ni abajo de la muestra.
1	Zona limitada a una área sobre la muestra.
2	La zona se extiende más allá de la muestra, menos de 5 cm
3	La zona se extiende más allá de la muestra 05 a 1 cm.
4	La zona se extiende más allá de la muestra más de 1 cm pero no abarca toda la caja de cultivo.
5	La zona envuelve toda la caja de cultivo.

Tabla 2. Descripción de la Lisis. (41)

Índice de Lisis	Descripción de la zona
0	No se observa citotoxicidad.
1	Zona afectada menor del 20 %.
2	Zona afectada entre el 20 y 39 %.
3	Zona afectada entre el 40 y 59 %.
4	Zona afectada entre el 60 y 80 %.
5	Zona afectada mayor al 80 %

PRUEBA ESTÁNDAR PARA LA ESTIMACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD CELULAR Y DE TEJIDO PARA MATERIALES Y APARATOS PARA PRÓTESIS OROFACIAL. (43)

INTRODUCCIÓN

Esta práctica es útil para estimar el potencial citotóxico de nuevos materiales o formulaciones con posible aplicación médica y como parte de un programa de control de calidad para aparatos médicos propuestos para la fabricación de injertos o implantes en la región orofacial. Esta práctica está restringida al uso de tejido orofacial humano normal no transformado (TOH) extraído de un donador y de líneas celulares humanas establecidas (LCHE). (56)

Esta práctica puede ser útil para determinar los efectos de la edad, la radiación, el estado de carcinogenicidad y la sensibilidad de los tejidos TOH a materiales y aparatos usados para prótesis orofacial. (35)

El tejido (TOH), es cultivado en suero humano, como un sistema para estimar la biocompatibilidad de materiales de prótesis para la reconstrucción orofacial. Este sistema es correlacionado con el uso de líneas celulares establecidas, tomando en cuenta el conocimiento de la variabilidad extensa de fuentes de tejido humano, suero humano, y sus componentes separados.

El suero humano se procesa para remover entidades moleculares que están como contaminantes y nativas por medio de diálisis y cromatografía en columna con eluciones iónicas de buffers sobre microcuentas de vidrio.

Para monitorear la calidad y la uniformidad del suero humano procesado, se realizan cultivos con una LCHE, la cual sirve como una referencia estándar para poder cultivar el tejido TOH para la prueba de biocompatibilidad. El uso de líneas celulares establecidas como referencia, con factores de crecimiento definidos, proporcionan un medio para comparar la sensibilidad de las células TOH, ya que de esta forma nos proporcionan resultados relevantes para estimar la biocompatibilidad y la seguridad para el uso de materiales de prótesis en la región orofacial.

Existe una variedad de métodos de cultivo celular para células humanas, los procedimientos relacionados y medios se pueden encontrar comúnmente en la bibliografía, para tomar en cuenta que tipo celular se va a emplear, de acuerdo al sitio anatómico donde se va a colocar el biomaterial. La literatura publicada proporciona numerosos estudios de métodos de cultivos celulares "in vitro" y procedimientos de células humanas normales no transformadas. La tabla 6 proporciona un resumen del continuo desarrollo y modificaciones de los métodos del cultivo celular y algunas características principales entre las cuales están: el empleo de células adultas que se usan más en las pruebas clínicas, que las células embrionarias; debido principalmente a que las embrionarias tienen complicación para estabilizarse y llegar correctamente al estado confluyente.

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

- El tejido orofacial humano (TOH) y la LCHE son cultivadas en medio A3 con suero homólogo humano en matraces de cultivo celular o recipientes apropiados. Se llevan a cabo las siguientes series de cultivos celulares:

a) Cultivo de control primario, con el cual se verifica la calidad del suero y el factor de crecimiento procesados.

b) Cultivo de prueba, en el que el material a probar se coloca en contacto con la capa celular para su evaluación citotóxica (de este cultivo se pueden llevar a cabo una o más réplicas, según las necesidades).

c) Cultivo con un control positivo, en el que la capa celular esté en contacto con un material que provoque una respuesta tóxica conocida, como un químico tóxico que se encuentra en la lista de materiales tóxicos referidos en la literatura.

d) Cultivo con un control negativo, en el que la capa celular esté en contacto con poliestireno o algún otro material que no provoque un efecto tóxico.

Se observan todos los cultivos diariamente para señalar el crecimiento y toxicidad. La prueba debe ser terminada hasta alcanzar la confluencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras de control (referencia) y muestras de prueba

A) El control negativo debe ser un material que no inhiba el crecimiento celular permitiendo que el cultivo llegue hasta la confluencia. Puede usar el siguiente material:

- Estándar de referencia de control negativo de plástico de la USP; película u hoja de fluorocarbono (FEP teflón) de 10 mm (0.010 pul) de grueso, este fluorocarbono es usado por que es un químico excepcionalmente inerte, con alta gravedad específica, más grande que la mayoría de los nutrientes del medio, y de claridad excepcional para revisar la estructura celular. (57)

- También se pueden usar el poliestireno que comúnmente se usa para fabricar los frascos de cultivo de celular.

B) El control positivo debe ser un material que provoque un efecto tóxico en el cultivo celular, tal como la goma de látex de un catéter de Foley o el fenol, que están registradas en la literatura como sustancias tóxicas. Sin embargo el fenol es un tóxico de referencia común (40), su solubilidad acuosa y por consiguiente su lixiviación es también rápida. Por conveniencia, use alternativas menos solubles, use alguno de sus anillos sustitutos cloro o nitro derivados enlistados en el registro de algunas referencias de sustancias tóxicas.

C) El material de prueba, debe ser el material que se usa en la prótesis o un material potencialmente biocompatible.

- Todos los materiales de prueba para prótesis, incluyendo los controles positivos y negativos deben estar en la forma sustancial similar o equivalente de película u hoja.

- Prepare los materiales de prueba y de control en forma de pequeñas películas con un intervalo de 0.1 a 1 mm de grueso, cortadas de forma cuadrada o triangular, cada lado

debe medir de 10 a 15 mm. Antes de colocarlas en el cultivo además de esterilizarlas y para asegurar que queden totalmente inmersas e inmobilizadas realice un par de ranuras a los lados de éstas y ensarte una o dos cubiertas de vidrio limpias de 9 por 50 mm a través de las ranuras. También haga uno o más orificios de 3 mm de diámetro en el centro de las muestras de prueba y de control, para proporcionar un área de alta concentración de sustancias lixiviadas y también un foco para un registro fotomicrográfico.(ver figura 1).

-Proporcione para todas las muestras los siguientes datos: descripción de la forma: cuadrada, rectangular, etc, densidad o gravedad específica, grueso (mm), peso (mg), área de superficie (m^2), volumen (ml), y la razón de área/volumen.

Preparación de cultivos:

a) Adapte al crecimiento las células humanas de referencia LCHE en medio Holmes A3 añadiendo lo siguiente:

- Una densidad celular de 10^3 a 10^4 células/ml.

- 10 % de suero humano procesado (ver anexo A1).

- Una serie de factor de crecimiento alfa (FCA) comprendiendo 0, 0.1, 1.0, y 10 μg (bases secas) por mililitro de medio.(ver anexo A.2)

- Haga cuatro series de cultivos y dejelos crecer hasta una capa confluyente, incubándolos a $37^\circ \pm 1^\circ C$ con una atmósfera con 5 % de CO_2 y 95 % de aire, cambie el medio tres veces por semana. Esto es esencial para reconocer las diferentes fases del crecimiento celular, las cuales incluyen: (I) adaptación, usualmente con decremento de la población celular por uno o más días, siguiendo un largo crecimiento (II), generalmente referido al tiempo de duplicación de la población permitido para la confluencia de la monocapa celular (III), y finalmente hasta el declinar (IV) de la población celular debido a la senescencia o toxicidad. En esta fases, puede ser aplicado el conteo periódico celular hasta la confluencia (V).

- Anote la complementación mínima necesaria de FCA después de que se haya alcanzado la confluencia sobre el intervalo de éste (de 0 a 10 $\mu g/ml$), para usarla en el procedimiento de biocompatibilidad.

-Mantenga la línea celular referida (LCHE) como cultivo de cepas (stock), la confluencia es generalmente alcanzada en 5 días.

-Cambie los medios de cultivo cada 48 a 72 horas.

-Revise los cultivos microscópicamente en los tiempos mencionados y observe si hay algunos cambios morfológicos o contaminación, ya que estos cultivos son una fuente de células para la estimación de la biocompatibilidad, para averiguar y verificar la calidad del suero humano procesado y la preparación del FCA separado.

b) Preparación y mantenimiento del tejido orofacial humano (TOH):

-Extraiga de la región orofacial ya se del tejido gingival, mucosa bucal o nasal un explante.

-Coloque el explante de tejido humano en una caja de petri estéril conteniendo una gasa cubierta con medio Holmes A3 y 10 % de suero humano procesado.

- Disecte el explante en pequeñas piezas, cortar rebanadas de 1 a 2 mm de grueso y aproximadamente de 2 a 4 mm^2 de área.

- Incube a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con una atmósfera con 5 % de CO_2 y 95 % de aire en series cuadruplicadas de contenedores de cultivo hasta que se forme una monocapa, confirmando microscópicamente a las 48 y 72 horas.
- Agregue tripsina en medio fresco al 25 % una vez que se haya alcanzado la confluencia para que se desprendan las células.
- Coloque las células tripsinadas en frascos de cultivo estériles para preparar una cepa celular de primer paso, para la prueba de biocompatibilidad.
- Revise el primer paso de cultivo celular por si se encuentra contaminación y descarte si presenta, identifique el tipo de contaminante.
- Coseche el cultivo celular propagado y úselo en cantidades necesarias para la estimación de la biocompatibilidad.
- Almacene alguna porción del cultivo celular que no use en glicerol o dimetilsulfoxido (DMSO) a -70°C para nuevas series de pruebas.

Estimación de la biocompatibilidad del material de prueba

- Use tres combinaciones de tipo celular y suero (A, B y C de la tabla 1), junto con el formato mostrado en la tabla 2, para estimar la biocompatibilidad de las muestras del material de prótesis
- Decante el glicerol o el dimetilsulfoxido (DMSO) de la cepa celular primaria (TOH) almacenada.
- Suspenda la cepa celular primaria (TOH) en medio A3 fresco, o medio equivalente, con aditivos óptimos de suero, insulina y factor de crecimiento descrito en la tabla 1, usando tripsina.
- Use un hemocitómetro para contar las células y poder realizar lo siguiente:
- Coloque una alcuota de 10^3 hasta 10^4 células/ ml, en cada una de las series cuadruplicadas de la tabla 2, con medio A3.
- Reemplace el medio de cultivo tres veces por semana o cada 48 horas por 7 días.
- Examine cada uno de los cultivos B, C y D de la tabla 2, y compare las anomalías del crecimiento celular, éstas deben incluir la evidencia visual de (a) malformaciones o degeneración de la estructura, (b) lisis celular, o c) reducción de la población celular por conteo, con respecto a la serie A de control de la misma tabla
- Prepare fotomicrografías con aumentos de 100 a 200 X de cada una de las series de la tabla 2, en diferentes días cultivados; 1, 3, 5, y 7 días para el análisis cualitativo (marcaje) de células, aplicando un apropiado sistema de porcentaje de toxicidad. El sistema apropiado de marcaje debe ser alguno de los convencionales descritos ya en la literatura, en los cuales se aplica un grado o marca de 0 = no toxicidad, y de 1 a 4 para el grado de degeneración o inhibición celular.
- Opcionalmente puede continuar la confluencia de la monocapa más allá del período de 7 días, continúe el mantenimiento de la serie de cultivos revisando indicios de reacciones citotóxicas y el registro micrográfico con intervalos semanales aproximadamente, hasta completar 30 días, o hasta terminar debido al total fallecimiento de células (más del 75 %).
- Fije el cultivo celular con formaldehído deshidratado al final de los 7 o 30 días de prueba, posteriormente coloree el cultivo con hematoxilina y eosina.

- Aplique opcionalmente un análisis bioquímico a los cultivos como se indica en la tabla 2, para evidenciar la transformación celular durante el curso de los 7 o 30 días de prueba, observando posibles cambios bioquímicos y citogenéticos de la cepa primaria y la cepa de referencia celular. La estimación bioquímica debe incluir actividades de enzimas clave, para el caso; deshidrogenasa láctica o lactosa y la citogenética, aberraciones cromosómicas.
- Las células cultivadas por estimación bioquímica y o conteo deben ser enjuagadas al menos dos veces con 4 ml de medio A3 fresco o su equivalente seleccionado, sin aditivos.
- Colecte las células enjuagadas, al término de la fase de prueba, en frascos de cultivo con 1 ml de medio A3, selecciónelas para estimación bioquímica, si no se usan inmediatamente almacénelas en frío a - 70°F hasta que sean usadas para la estimación bioquímica o conteo celular, o ambos.

Validez y estandarización

El rango de estandarización de la biocompatibilidad debe ser juzgado válido sólo cuando las respuestas morfológicas sean evidentes con respecto a los controles negativos y positivos.

La estimación estadística convencional debe ser aplicada por medio de la prueba de P*(hipótesis nula) para comparaciones pares con los controles de referencia tóxicos y no tóxicos, para cualquier período de tiempo entre los 7 y los 30 días.

El rango de citotoxicidad debe basarse en algunos de los siguientes criterios: lisis celular visible o daño celular, o ambos, en la vecindad del material de prueba, reducción marcada en el conteo celular por conteo directo o medios equivalentes, tal como el análisis de DNA, cambios marcados en niveles enzimáticos cuando se compara con controles, que son determinados por análisis de enzimas blanco determinadas.

La no-toxicidad debe estar también basada en la carencia de la estimación tóxica utilizando el análisis microscópico y fotomicrográfico mencionado arriba.

ELABORACIÓN DEL REPORTE

Reporte la siguiente información:

Toda la información posible es necesaria debido a que las pruebas por ser estándar internacionales deben ser comparadas con otros laboratorios :

- Células de prueba utilizadas
- Designación de la línea celular establecida utilizada.
- Designación de las células humanas utilizadas; clasificación anatómica, piel facial, labio, mucosa bucal, paladar, nasal faríngeo, etc.
- Historia anterior del cultivo primario, medio de adaptación, traslados, etc.
- Resultados de acuerdo con la tabla 2.
- Medio utilizado.
- Factor o factores de crecimiento, que son FCA o sustitutos, o ambos.
- Método preparativo general, si es plasma humano o de suero, y la concentración o prueba empleada.
- Fuente disponible comercialmente del medio, factores de crecimiento celular, etc, con determinada concentración usada en la prueba.

- Muestra de material propuesto para uso médico
 - Determinación química general de los principales componentes.
 - Determinación comercial de los principales componentes, si es proporcionado como artículo de comercio, por la clasificación, tipo o grado, con identidad de lote u hornada.
 - Caracterización molecular del componente principal en términos de peso molecular, grupo en el espectro de frecuencia del infrarrojo(IR), análisis térmico diferencial (DTA) o exploración calorimétrica diferencial (DSC).
 - Componentes aditivos, tal como catalizadores, estabilizadores, filtros, pigmentos y colorantes con determinación química convencional.
 - Método general de procesamiento o conversión de los materiales utilizados en su fabricación .
 - Principal uso de las propiedades tensiles y resistencia al rasgado en: (a) muestra de prueba fabricada no expuesta y (b) muestra de prueba apropiadamente expuesta a réplica de metabolitos reactivos, nombrando, al menos (1) glicerina seleccionada o un aceite vegetal comestible, y (2) ácido láctico.
 - Cuantificación y medición de las muestras de prueba.
 - Densidad de la muestra (gr/cm^3 a temperatura estable).
 - Peso en (gr).
 - Grueso (cm), ancho (cm), longitud (cm).
 - Volumen (cm^3) .
 - Volumen (cm^3) del medio de prueba por mantenimiento.
 - Volúmenes totales (cm^3) de medio hasta evaluar la citotoxicidad.
- Razones de:
- Área / peso de la muestra
 - Peso de la muestra /volumen del medio de prueba
 - Proporcionar relación resumida con una valoración graduada, de 0 para no tóxico hasta +4 para toxicidad extrema.
 - Transparencias montadas permanentemente teñidas y conteniendo el material de prueba, o fotografías de las transparencias mencionadas arriba y algunas otras fotografías tomadas durante la prueba las cuales pueden servir como un registro permanente de los resultados.
 - Todos los datos cuantitativos derivados de los conteos celulares, análisis de DNA, análisis de enzimas, etc.

ANEXOS

AI.- PREPARACIÓN DE SUERO HUMANO PARA SU USO EN MEDIO DE CULTIVO POR LA SEPARACIÓN Y PREPARACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO CELULAR.

El mejor suero se obtiene de sangre humana fresca coagulada no conteniendo aditivos. Sin embargo, este tipo de suero es difícil de obtener, los resultados satisfactorios pueden ser logrados a partir de plasma suministrado por un banco de sangre, aunque este plasma contenga un anticoagulante . La sangre del banco debe ser utilizada por completo antes de 48 hrs.

- Permita que la sangre se asiente en el paquete original por lo menos durante 48 hrs a una temperatur de 2 a 4 °C para obtener el plasma.
- Decante el plasma y centrifúguelo a 17210 g por 20 min a 20°C para remover residuos de células sanguíneas.
- Lleve a cabo la diálisis del plasma con una solución balanceada de sales conteniendo 48 gr de NaCl, 4.8 gr de KCl, 2.4 gr de MgSO₄-7H₂O, 1.68 gr de CaCl₂-2H₂O, 1.37 gr de Na₂HPO₄-7H₂O, y 0.72 gr de KH₂PO₄ en 12 litros de agua desionizada y destilada. La diálisis es llevada a cabo en tubos de membrana Spectrapor de peso molecular de exclusión de 3500. El tiempo de diálisis total es de 48 hrs. La solución balanceada de sales es cambiada después del primer período de 24 hrs. El tratamiento de diálisis sirve para remover tóxicos, medicamentos ingeridos, tejido, etc.
- Al terminar la diálisis, el plasma se coagula dentro del tubo como resultado de la remoción del anticoagulante y la introducción de calcio como se menciona arriba. El suero resultante es sacado del tubo y almacenado en frío (de 2 a 4°C). Este se puede utilizar posteriormente, directamente en el cultivo o para la elución del factor FCA..

A2.- PRODUCCIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ALFA (FCA)

Preparación de las microcuentas de vidrio para llevar a cabo una cromatografía o elución en columna:

- Coloque las cuentas secas en una cubeta de precipitación de vidrio hasta un volumen de 500 ml.
- Añada 50 gr de Haemosol grado enzima activa (EA) seguido de 1 litro de agua caliente destilada o desionizada (60 a 70°C) mientras se revuelve por 1 minuto.
- Permita el ligamiento de la enzima a las microcuentas, dejándola estacionaria en un cuarto de temperatura toda la noche o aproximadamente 16 horas.
- Remueva el agua al siguiente día por decantación o por succión.
- Lave las microcuentas cuatro veces con 1 litro de agua destilada o desionizada para remover el Haemosol sobrante.
- Añada 250 ml de ácido hidroclohídrico concentrado y ajuste el volumen y las microcuentas a 1 litro con la adición de agua destilada o desionizada.
- Agite la suspensión resultante de las microcuentas por 2 minutos y permita que se establezcan toda la noche bien tapadas para retener el vapor del ácido (HCl).
- Decante el ácido y enjuague 5 veces con 1 litro de agua destilada o desionizada. Las microcuentas lavadas son almacenadas en este estado para el uso siguiente o futuro.

Preparación de la columna de microcuentas:

- Lave la columna con 50 ml de Haemosol y enjuague con 500ml de agua destilada o desionizada, regulando el flujo del chorro de 2 a 5 ml/minuto.
- Antes de colocar las microcuentas en la columna, lave éstas con 2 litros de una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0.6. M. Este pretratamiento neutraliza los cambios de acidez en el lavado regular de ácidos de microcuentas, así previene la formación de burbujas atrapadas en la columna.

- Vacíe la suspensión de microcuentas en bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0.6 M en la columna a una profundidad de 25 cm.
- Coloque un papel cromatográfico de 5 cm (Whatman de 3mm de grueso), encima del nivel de las microcuentas. El papel puede estar flotando hasta que las burbujas de aire no estén atrapadas entre ésta y la capa de microcuentas.
- Drene el sobrenadante de la solución de bicarbonato hasta el límite de la interface del papel filtro y las microcuentas, cierre el flujo por medio del adaptador de teflón inferior.
- Coloque 200 ml de una solución 0.6 M de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) pH 8.0, sobre la columna y permita que ésta corra totalmente por gravedad con un intervalo de 30 a 40 gotas/minuto.
- Asegúrese de que la columna nunca se seque. Para al flujo, la columna puede ser presionada por medio de aire comprimido no mayor de 18 Pul. (ver figura 2).
- Cuando la capa de bicarbonato sobrenadante alcanza la interface papel-cabeza, detenga el flujo cerrando el drene adaptador de teflón; la columna ya está lista para la fraccionar el suero humano dializado (anexo A1).

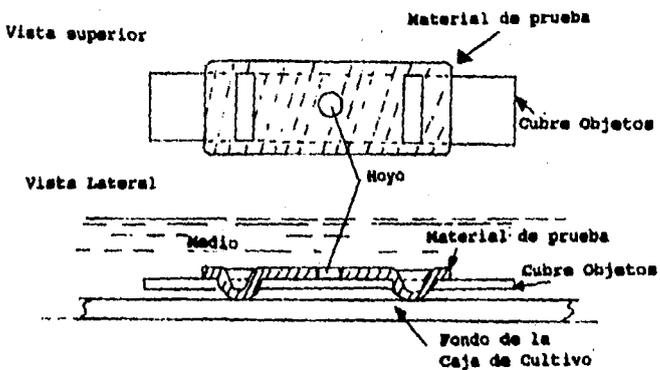
Preparación de las soluciones de la columna de elución:

- Prepare las series de la lista de soluciones patrón enlistadas en las tablas 3 y 4, almacene en recipientes bien tapados y úselas por un máximo de 12 semanas.
- Prepare previamente las series de soluciones enlistadas en la tabla 5 antes del procedimiento de separación.
- Añada poco a poco 20 ml de suero humano dializado, utilizando dos pipetas de 10 ml, esto se añade después de que en la columna ha sido añadido el bicarbonato de sodio 0.6 M.
- Después que se colocan los 20 ml de suero en la columna, añada 200 ml de bicarbonato de sodio 0.6 M (Na HCO_3), con pH 8, primero se añaden 10 ml con una pipeta del mismo volumen dejando caer la solución en la pared interna para enjuagar el suero absorbido.
- Después de colocar los 10 ml iniciales de bicarbonato, los restantes 190 ml son cuidadosamente vertidos en la columna para no perturbar la capa de papel filtro y la capa subyacente de las microcuentas.
- Ajuste el intervalo de flujo de 30 a 40 gotas por minuto por medio de la llave de teflón del grifo, colecte fracciones de 10 a 12 ml en tubos de prueba, que se colocan en un espectrofotómetro con un detector variable de longitud de onda para localizar el punto máximo de colección del factor de crecimiento alfa a 280 nm.
- Con la disminución de la elución del bicarbonato de sodio, proceda a lo siguiente añada 100 ml de la solución de $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ y siga colectando la fracción y monitorea la absorbancia a 280 nm.
- Siguiendo ininterrumpidamente la elución de la solución de $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$, proceda con la elución de 150 ml de agua destilada.
- Siguiendo ininterrumpidamente la disminución de la elución del agua destilada, proceda con la elución de 200 ml de $\text{KHCO}_3\text{-K}_2\text{CO}_3$.
- Siguiendo ininterrumpidamente con la disminución de la elución de la solución de $\text{KHCO}_3\text{-K}_2\text{CO}_3$, proceda a lo ultimo, elución de agua destilada.

- Si es necesario, eluir un total de 670 ml desde la columna para asegurar que todas las fracciones del factor de crecimiento activo han sido eluidas en el buffer de elución de KHCO_3 - K_2CO_3 .

Identifique y colecciona las fracciones de FCA:

- Usando la detección a 280 nm de la fracción del FCA, siguiendo el ion potasio del buffer (pH 9.6), colecte de 6 a 10 tubos de prueba con las fracciones absorbidas a 280 nm.
- Coloque las fracciones en una membrana de diálisis (Spectra/Por 2. Membrane, 12000 a 14000 MWCO).
- Suspenda el contenido de la membrana de diálisis en 8 a 10 ml de agua destilada o deionizada a 4°C con constante agitación.
- Después de 6 hrs mínimo, cambiar el agua y continuar la diálisis por 16 hrs.
- Esterilice el factor FCA por filtración a través de un filtro de 0.2 µm.
- Almacene el factor FCA en un recipiente estéril.



Nota 1- Las muestras menores a 1 mm de grueso tienden a flotar. La figura describe un método para mantener sumergidas las muestras para que estén en contacto con el cultivo celular.

Nota 2- Las dimensiones y la configuración del hoyo, sirven para el tamaño inicial de células, opcionalmente puede ser modificada, especificando los cambios apropiadamente.

FIG. 1 Diagrama del método para mantener las muestras sumergidas e hidratadas.

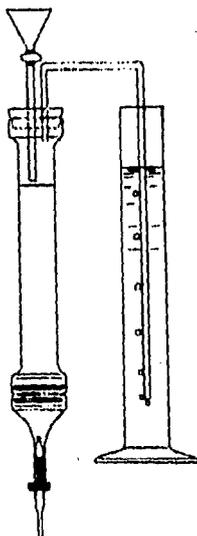


FIG. 2. Diagrama Representativo de la Separación Cromatográfica del Pícar de crecimiento Proteína A10 de Hansen (APF) de Suero Humano destiende

Tabla 1. Tipos celulares de prueba, medios sueros opcionales. (43)

Tipo Celular	Medio	Suero humano en %
(A) Oroficial Humano	A3 con medio 6.60	10
(B) Línea Celualr Establecida*	A3	(reemplazado por 0.1 a 10 % de FCA)
© Línea celular establecida*	A3	10

*Las combinaciones (B) y (C) de esta tabla son usadas para asegurar la viabilidad celular y la lo apropiado del procedimiento.

TABLA 2 Formato de Biocompatibilidad para Células Humanas Primarias, para 7 o 30 Días (opcional) de cultivo. (43)

Material de prueba en series de cultivo	Número de frascos de cultivo	
	Estimación morfológica.	Estimación bioquímica opcional.
a) Ningun procedimiento de control.	4	4
b) Muestra de prueba de la pótesis o de un material potencialmente biocompatible.	4	4
c) Control positivo (referencia citotóxica)	4	4
d) Contro negativo (referencia no citotóxica).	4	4

a) Las cepas celulares en esta matriz deben ser aspirados de un caldo de cultivo mantenido en el mismo medio A3 o medio equivalente que es complementado y seleccionado para este formato.

b) El periodo opcional de 30 días, o mas largo, debe ser regulado dependiendo de las células y de las modificaciones del medio, ya que el crecimiento de las células humanas debe tener periodos extensos de adaptación.

c) Para la estimación de la viabilidad y la transformación celular, o ambas.

d) Cuando se usan contenedores de poliestireno no citotóxicos, la serie (a) puede ser usada como control negativo en vez de la serie (d)

Tabla 3. Soluciones para buffers de elución. (43)

Solución	Cantidad	pH
0.6 M NaHCO ₃	100.0 gr/2l.	8.0
0.2 M Na ₂ CO ₃	42.4 gr/2L.	Desajustado
0.4 M K ₂ CO ₃	130.6 gr/2L.	Desajustado
1.2 M KHCO ₃	340.2 gr/L.	Desajustado
0.2 M Na ₂ CO ₃	42.4 gr/2L.	Desajustado
0.4 M K ₂ CO ₃	130.6 gr/2L.	Desajustado
1.2 M KHCO ₃	340.2 gr/L.	Desajustado

Tabla 4. Preparación del Buffer de elución. (43)

Solución	Volumen	pH Final	Volumen utilizado
0.6 M NaHCO ₃	200 ml	
0.2 M Na ₂ CO ₃	390 ml	9.5 ± 0.02	100 ml
0.4 M K ₂ CO ₃	429 ml	
1.2 M KHCO ₃	572 ml	9.6 ± 0.1	200 ml

Tabla 5. Soluciones que se añaden a la columna de elución. (43)

Soluciones	Volumen
Suero Humano	20 ml
NaHCO ₃	200 ml
NaHCO ₃ - Na ₂ CO ₃	100 ml
Agua destilada	150 ml
KHCO ₃ - K ₂ CO ₃	200 ml
Agua destilada	250 ml

TABLA 6. Desarrollo y Modificaciones de Métodos de cultivo de Células Humanas.
(43)

Designación por Autor.	Fuente	Tipo Celular.	Nutriente Primario.	Tipo de Suero	Etapas de Prueba Crecimiento Celular	Días de Prueba.	Criterio de Toxicidad.	Implicación Clínica.
A. Métodos Heterólogos de cultivo Célula-Suero								
ASTM F813 Austin (1968) Wilenak (1976)	Ratón.	Tejido conectivo	MEM.	Bovino	Confluencia	1	Inhibición morfológica, lisis, etc.	Prueba de seguridad general
	Feto Humano	Pulmón Prepuccio	MEM. MEM.	Bovino Bovino	Confluencia Confluencia	1 1		
Healen-Peszmen (1977)	Humano adulto	Línea celular de mucosa laríngea	MEM	Bovino	Proliferación	3	Morfológico, Inhibición	Seguridad para resinas dentales para tejido humano
Va (Lantz, et al) (1977)	Humano adulto	Orofacial	MEM	Bovino	Proliferación	30	Morfológico, inhibición, lisis, etc.	Maxilofacial y oral.
B. Métodos de Cultivo Homólogos Células Humanas-Suero Humano								
Devison, et al (1980)	Humano recién nacido	Endotelio, prepucio	MEM	Humano	Proliferación	10	Morfológico, velocidad de crecimiento, forma.	(Potencial)
Devison, et al (1980)	Humano adulto	Endotelio (meloplastia, manuplastia)	MEM	humano + (factores de crecimiento)	proliferación	16	Morfológico, velocidad de crecimiento, edad variable.	Propósito de prueba
Va (Lantz, et al) (1978)	Humano adulto	Orofacial	MEM	Humano + (factores de crecimiento)	Proliferación	30	Morfológico, inhibición, lisis, etc.	Maxilofacial y oral.

PRUEBA ESTÁNDAR PARA ESTIMAR LAS PROPIEDADES HEMOLÍTICAS DE MATERIALES.(38)

INTRODUCCIÓN

Esta práctica proporciona un método "in vitro" para la estimación de las propiedades hemolíticas de materiales usados en la fabricación de aparatos médicos que tendrán contacto con sangre.

Esta práctica consiste en dos procedimientos; el procedimiento A, que describe una prueba en condiciones estáticas y el procedimiento B, que describe una prueba que en condiciones dinámicas, puede usarse uno o ambos procedimientos para la evaluación.

Esta práctica es una de las varias desarrolladas para la estimación de la biocompatibilidad de materiales.

La presencia de un material hemolítico en contacto con la sangre puede incrementar los niveles de hemoglobina en plasma y es capaz de inducir efectos tóxicos u otros efectos los cuales pueden causar tensión al riñón ó a otros órganos.

Esta práctica se presenta como un procedimiento de escrutinio para comparar el potencial hemolítico de un material con un material de control, el cual debe ser generalmente conocido por ser apropiado para estar en contacto con la sangre.

El procedimiento que se presenta en este trabajo es una prueba reproducible. Esto no quiere decir que sea el más sensible, ni el más específico para estimar el potencial hemolítico de los materiales. Los resultados obtenidos con este procedimiento son usados en conjunto con los resultados de otras pruebas que estiman la compatibilidad sanguínea de los materiales de prueba.

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

Las muestras de material de control y de prueba o extractos de estos son expuestos al contacto con sangre de conejos en condiciones estáticas (procedimiento A) y dinámicas (procedimiento B) y es medido el incremento de hemoglobina en el plasma. Las comparaciones son hechas con referencia a los materiales de prueba y de control probados en condiciones idénticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras de prueba y de control

-Prepare un mínimo de 6 réplicas cada una de 50 tiras o varillas rectangulares de muestras de prueba y 50 de control para ser probadas para hemólisis, cada una de 1 cm de longitud por 1 cm de diámetro o de una configuración apropiada para dar un área de superficie equivalente de 15.7 cm²/5 ml de sangre diluida o los extractos empleados. (Esta corresponde al área de superficie de plásticos recomendada por la USP, así como el material de control positivo) (57).

-Las muestras finales deben ser preparadas con un acabado de superficie apropiado, tal como se requiere para su aplicación y uso final.

- Esterilice las muestras, por medio de autoclave, luz ultravioleta, u otro método apropiado.

Recolección y preparación de substratos sanguíneos

- Obtenga sangre con una jeringa previamente heparinizada de tres conejos diferentes para cada prueba. Almacene la sangre a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ y úsela antes de 96 hr.
- No lave las células; use éstas suspendidas en el plasma original.
- Determine la cantidad de hemoglobina del plasma por medio del siguiente procedimiento:
 - Centrifuge una alcuota de 1 ml de cada muestra de sangre a 700 u 800 G en una centrífuga clínica estándar por 15 min.
 - Añada 100 μl de cada muestra de plasma a 5 ml de reactivo de Drabkin (1 g de bicarbonato de sodio; 0.05 gr de cianuro de potasio, 0.2 gr de ferrocianuro de potasio y diluido con agua destilada hasta 1 litro).
 - Deje la muestra estacionaria 15 min. Lea la absorbancia de la solución con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.
 - Prepare una curva de calibración y calcule los resultados en miligramos de hemoglobina liberada, de acuerdo con algún estándar que comúnmente se encuentran en la literatura.
 - Si la hemoglobina de plasma libre es más grande que 1 mg/ml, no use las muestras de sangre para esta prueba, en caso de que no sea mayor realice lo siguiente:
 - Diluya los substratos sanguíneos añadiendo 20 μl de cada mezcla buena a 5.0 ml de reactivo de Drabkin.
 - Deje la solución resultante estacionaria 15 min, pasando este tiempo lea la absorbancia de la solución con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.
 - *Determine la concentración de hemoglobina sanguínea de acuerdo con algún estándar que comúnmente se encuentra en la literatura
 - Ajuste el contenido de hemoglobina total de cada muestra de sangre a menos de 2.5 ± 0.25 mg/ml diluyendo con una cantidad apropiada de solución salina normal, estas diluciones serán utilizadas en ambos procedimientos A y B.

PROCEDIMIENTO "A" (PRUEBA ESTÁTICA)

- Procese como sigue las muestras de prueba y de control cortadas y preparadas a la medida que se especificó al inicio de la metodología:
- Prepare un extracto de cada una de las tres réplicas de las muestras de cada material de prueba, de acuerdo con la práctica de extracción que se menciona en este trabajo y use las condiciones que se describen en ésta, utilice la temperatura más altas que el material pueda soportar, para mayor información consulte la referencia (38).
- Transfiera 4 ml del extracto resultante de cada muestra de los especímenes del material de prueba a vasos de borosilicato individuales, químicamente limpios, siliconizados, de 16 por 150 mm, con tapa atornillable.
- Transfiera cada una de las tres muestras no extraídas de los muestras de prueba en tubos individuales tal como se describió para los extractos.
- Coloque 5 ml de substrato sanguíneo diluido a 2.5 ± 0.25 mg/ml en solución salina, tal y como se describió anteriormente en cada tubo que contienen las muestras no extraídas y en las que contienen el extracto resultante, una vez hecho esto se tapan los tubos.
- Mantenga los tubos estacionarios por 4 hr a 37°C .

- Centrifugue todos los tubos a 100 o 200 G en una centrífuga clínica estándar por 15 min.
- Transfiera cada fracción de plasma sobrenadante libre de células a tubos individuales de vidrio de borosilicato de 16 a 150 mm. Recentrifugue a 700 u 800 G por 5 min.
- Remueva el sobrenadante cuidadosamente para evitar revolver algún botón de eritrocitos los cuales pueden estar presentes. Coloque el sobrenadante en un tercer tubo de borosilicato con tapa enroscable.
- Analice las muestras del paso anterior para hemoglobina usando el método siguiente:
- Si no se usan las muestras inmediatamente, pueden ser tapadas, congeladas, y almacenadas para subsecuentes análisis de hemoglobina.

Determinación de hemoglobina (método directo):

- Añada 1.0 ml del sobrenadante a 3.0 ml de reactivo de Drabkin.
- Deje la muestra estacionaria 15 min, después lea la absorbancia de la solución con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.
- Prepare una curva de calibración de acuerdo con las especificaciones de algún estándar, use un estándar de referencia tal como la sigma de hemoglobina No. 525 o equivalente. Calcule los resultados en miligramos de hemoglobina liberada. (50)
- Diluya la solución estándar reconstituida (6 mg/ml) 1+10, 1+20, 1+50, 1+100, y 1+200 con reactivo de Drabkin para dar concentraciones de 0.60, 0.30, 0.12, 0.060 y 0.30 mg/ml. Deje las muestras estacionarias por 5 min. Lea la absorbancia contra un reactivo blanco de Drabkin en un espectrofotómetro a 540 nm.
- Determine la concentración de hemoglobina de plasma en cada uno de los sobrenadantes usando la curva de calibración.
- Calcule el índice hemolítico (I.H) como a continuación se describe:

$$I.H = \frac{\text{Hemoglobina liberada (mg/ml)}}{\text{Hemoglobina presente (mg/ml)}} \times 100$$

- Un índice hemolítico es mayor al 50 %.

Determinación de hemoglobina (métodos alternativos)

- Puede determinar el hierro presente en el o los sobrenadantes de acuerdo con los métodos de las referencias 19 y 21 o un método equivalente.
- Convierta la concentración de hierro a la concentración de hemoglobina al multiplicar los valores de hierro en miligramos por 2.96.

PROCEDIMIENTO "B" (PRUEBA DINÁMICA)

- Debe llevarse a cabo como se describe para el procedimiento A con la excepción de que en vez de mantener los tubos estacionarios, éstos deben estar en movimiento, como sigue: los tubos de una alfeuota de sangre estándar deben moverse de 30 ± 6 movimientos en círculos, o laterales por minuto durante 1 hr a 37°C. Los tubos deben estar en movimiento con un ángulo máximo de ± 45°.

REPORTE

- Exprese los resultados en forma de un índice hemolítico el cual es el porcentaje de hemoglobina liberada de la hemoglobina presente total.
- El reporte final, como mínimo debe incluir lo siguiente:
 - Descripción de la muestra detallada, incluyendo nombre genérico y químico, número de catálogo y otras designaciones disponibles pertinentes o descripciones requeridas.
 - Detalles de la preparación de muestra y de control, incluyendo medida de muestra, la configuración de las muestras de prueba y método de esterilización.
 - Edad de los substratos sanguíneos y tipo de anticoagulante usado.
 - Condiciones de prueba. Procedimiento A (estático) o procedimiento B (dinámico).
 - Método de determinación de hemoglobina.
 - Hemoglobina total presente en cada uno de los substratos de sangre.
 - Tabulación del nivel total de la hemoglobina sobrenadante.
 - Índice hemolítico para la muestra de prueba y los controles expresado en porcentaje total de hemoglobina presente.
 - Desviación media o estándar para cada una de las series de tres substratos.
 - Otras observaciones pertinentes del experimento.

B) PRUEBAS "IN VIVO"

PRUEBA ESTÁNDAR PARA PROBAR BIOMATERIALES EN CONEJOS POR IRRITACIÓN PRIMARIA DE PIEL. (32)

INTRODUCCIÓN

Esta práctica proporciona un procedimiento, para estimar la irritación que puede provocar un biomaterial a través del contacto con la piel de conejo.

Los resultados de esta práctica dependen de la efectividad del contacto entre la piel y el material de prueba, así como de su establecimiento y mantenimiento.

De la técnica del operador depende el éxito de ésta prueba, es importante que sea llevada a cabo por personal capacitado.

Los materiales que están en contacto con la piel, a veces, no son los causantes de la irritación, es probable que la irritación se deba a las sustancias lixiviadas de éstos. Esta práctica proporciona una prueba directa de contacto material-piel, o expone la piel a los líquidos extraídos del material de prueba.

Una de las razones por la cual se usa esta práctica en conejos es que es rápida, además el conejo tiene una piel muy sensible a irritantes y fácilmente los detecta, se ha usado por muchos años y ha llegado a ser un método aceptable.

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

La exposición de la piel de conejo al material de prueba se realiza usando una técnica a base de parches, los cuales son impregnados del líquido de extracción del material de prueba, o sujetan a películas de éstos. Se usan cuatro sitios, dos donde la piel está intacta y no tiene ningún trauma o excoriación y dos sitios donde la piel está rasgada o excoriada sobre la espalda de cada uno de los seis conejos albinos. La piel es rasurada un día antes de la prueba. La sustancia de prueba es aplicada usando 0.5 ml. para líquidos o extractos, 0.5 gr. para sólidos o semisólidos, y un parche cuadrado de 2.5 por 2.5 cm por capas. Después de la aplicación, cada sitio de prueba es cubierto con una gasa suave de 2.5 por 2.5 cm y el tronco es obstruido totalmente con una manga de polietileno. Después de 24 hrs, la manga, la gasa y el material de prueba son removidos y los sitios de prueba son evaluados para eritema y edema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de prueba

Las muestras de prueba pueden ser de tres formas:

- Extractos líquidos o salinos de prueba, de los cuales se utilizan 0.5 ml, éstos se obtienen por medio de la práctica de extracción mencionada en este trabajo o para mayor información puede consultar las referencias 13, 14, 15, 27.
- El pH de las soluciones debe ser medido y reportado.
- De materiales semi-sólidos se utilizan 0.5 gr.
- Películas de materiales sólidos de prueba, se utilizan con un tamaño de 2.5 por 2.5 cm.

-Se requiere un medio de control positivo para líquidos, debido a que la piel de los conejos sufre cambios de temperatura con la manipulación y se puede caer en un error al aplicar un material ya sea positivo ó negativo. Los controles positivos pueden ser usados para la validez del método de prueba. El uso de procaina al 5 % en HCl es sugerido como un control positivo.

Preparación de animales de prueba:

- 30 hrs antes de la prueba rasure la piel de la espalda de 6 conejos albinos jóvenes variedad Nueva Zelanda para exponer dos áreas a cada lado de la espina dorsal, de 10 cm. cada una,
- Para obtener un contacto más efectivo entre la piel y la sustancia de prueba, puede ser necesario el uso de un agente depilatorio no irritante.
- Localice dos sitios de prueba a cada lado de la espina. Alternativamente, el área puede ser dividida en cuadrantes con aplicación de sustancias de prueba y control en cada uno de los cuadrantes.
- Limpie el área expuesta de la espalda con alcohol.
- Usando una cuchilla estéril, rasgue dos de los cuatro sitios al mover una cuchilla en ángulos rectos a la piel con un movimiento rasgante para crear un área excoriada en la piel.
- Haga cuatro incisiones epidérmicas (las cuales penetren el estrato córneo pero no la dermis), con dos incisiones perpendiculares a las otras dos.
- Coloque la cantidad apropiada de material de prueba ya mencionada, sobre un sitio intacto y uno con incisión o rasguero. Coloque el material de control sobre los sitios intactos y rasgados. Si son líquidos impregne una gasa con la cantidad ya mencionada, si son sólidos, semi sólidos ó películas colóquelos directamente en la piel.
- Inmediatamente tape los sitios colocando una gasa de 2.5 por 2.5 cm de gasa suave sobre los sitios de control y de prueba. Asegure los parches con cinta adhesiva.
- Envuelva el tronco del animal con una manga de polietileno limpia, de modo que se ajuste a éste.
- Examine los sitios de prueba removiendo las mangas de polietileno, las gasas suaves, los materiales de control y de prueba, el exceso de los líquidos de control y de prueba a las 24 horas después de haber aplicado éstas. Use soluciones de alcohol para remover excesos de líquidos.
- Use el criterio de la tabla 1, para calificar los sitios de prueba para eritema y edema una hora después de remover los parches.
- Recalifique los sitios de prueba para eritema y edema a las 24 y 48 horas después de remover los parches de acuerdo con la tabla 1. Tenga cuidado al distinguir los sitios de prueba con eritema de los cambios pequeños de temperatura de la piel.
- Hay una posibilidad de infección asociada con la abrasión de la piel. Ya que la infección causa los mismos síntomas de irritación primaria (edema y eritema), y por eso es esencial asegurarnos que la reacción no es debida a la infección. Una reacción en los sitios de control podría ser un indicador de infección. Si hay sospecha de una infección, la prueba debe ser repetida con un nuevo animal.

- El índice de irritación primaria (IIP) para cada uno de los animales y las sustancias es el total de las calificaciones de piel intacta y rasgada (incidiada) para eritema y edema a la 1, 24, y 48 hrs. después de remover los materiales de prueba y de control, dividida por seis. El porcentaje de irritación primaria es igual a la suma de los IIP para cada una de las sustancias para todos los animales de prueba dividido por el número de animales de prueba.

REPORTE

- El reporte debe contener una descripción de los materiales de prueba, número de lote, medio, y procedimiento de extracción usado.
- El valor de pH de la solución de prueba y el medio de extracción.
- Los datos de prueba para eritema y edema se deben presentar de acuerdo con la figura 1.

TABLA 1 Criterio de Puntuación para las Reacciones de la Prueba. (32)

Reacción Puntuación	Descripción	
Eritema (ER)	Eritema y Escara	
	Sin eritema	0
	Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
	Eritema bien definido (de color rojo pálido)	2
	Eritema de moderado a severo (área bien definida y roja)	3
	Eritema severo (amorado y una leve escara)	4
Edema (ED)	Formación de Edema	
	Sin edema	0
	Edema muy leve (apenas perceptible)	1
	Edema leve (límites de área bien definidos por un levantamiento)	2
	Edema moderado (Límites elevados aproximadamente 1 mm)	3
	Edema severo (levantamiento mayor de 1 mm y se extiende más allá del área de exposición)	4

FIGURA 1 Forma de reporte para la prueba de irritación de piel de conejo. (32)

Prueba de Irritación primaria de Piel para Conejos Albinos													
Material de Prueba _____													
Material de control _____													
Resultados													
Número de animal	Puntuación de Irritación para Sitios de Piel Desgastada Después de Remover el Parche.						Puntuación de Irritación para sitios de piel Intacta Después de remover el Parche						PII
	1hr		24hr		48hr		1hr		24hr		48hr		
	ER	ED	ER	ED	ER	ED	ER	ED	ER	ED	ER	ED	
1													
2													
3													
4													
5													
6													
Suma Total (Suma de los PII) _____													
Promedio del Índice de Irritación Primaria (suma total /6) _____													

PRUEBA ESTÁNDAR PARA PROBAR MATERIALES EN CUYOS POR CONTACTOS ALÉRGICOS. (33)

INTRODUCCIÓN

Esta práctica sirve para determinar el potencial alergénico de una sustancia, o extracto de algún material por contacto dérmico.

Al seleccionar un nuevo material para contacto humano en aplicaciones médicas (implantes), es importante asegurarnos que el material no estimule el sistema inmune y produzca una reacción alérgica. La reacción puede ser debida a las sustancias que pueden lixiviarse de un material, esta práctica propone usar extractos de materiales o constituyentes de los mismos.

La razón por la cual esta práctica usa puercos de guinea, está basada en el hecho de que éstos han demostrado que son el mejor modelo animal para observar dermatitis provocada por la alergia que produce un material al hacer contacto con la piel y simula lo que pasa en la piel humana. El uso del complemento auxiliar de Freud y lauril sulfato de sodio tiende a incrementar el potencial de un material para causar una alergia. Por lo tanto, esta prueba se puede usar, para comprobar que un material no es alergénico y es la prueba animal más severa de uso común hoy en día.

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

Después de dos estados de inducción empleando un complemento auxiliar de Freud y lauril sulfato de sodio, la sustancia o extracto es colocada en parches, los cuales se colocan en la piel de los puercos de Guinea. Después de 24 hrs los parches son removidos y la piel es examinada para ver si hubo o no reacción alérgica, la intensidad de las reacciones se califican al remover los parches a las 24 y 48 hrs después de remover éstos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento de Inducción:

La inducción se lleva a cabo por medio de la aplicación de una inyección intradérmica. Las inyecciones se pueden preparar de diferentes formas, dependiendo si un material es polar o no polar, para esto se siguen los siguientes procedimientos:

a) Solución de constituyentes solubles en agua o extractos líquidos acuosos:

- Disuelva los constituyente de una material solubles en agua, por encima de su solubilidad máxima, no exceda de una concentración de 10 % en peso u obtenga un líquido de extracción acuosa como se describe en la práctica de extracción mencionada en este trabajo o para mayor información consulte la referencia (27).

-Combine éstas soluciones con volúmenes iguales de complemento auxiliar de Freud. Homogeneice mezclando continua y vigorosamente por 5 min. La emulsificación se completa cuando una gota es colocada sobre la superficie de un baño frío y permanece intacta.

Control positivo:

- Use Formaldehído al 5 % como sustancias de control positivo solubles en agua.
- Mezcle volúmenes iguales de esta solución con complemento auxiliar de Freud.
- También prepare el constituyente o extracto de un material a la misma concentración en agua sin el complemento auxiliar de Freud.

b) Constituyentes en aceite:

- Disuelva los constituyentes solubles en aceite de algún material en complemento auxiliar de Freud a una concentración de 10 % en peso.
- Combine volúmenes iguales de la solución auxiliar de Freud al 10 % con un volumen igual de agua, añadiendo lentamente el agua al auxiliar mientras se homogeneiza con un agitador rotatorio por 5 minutos. La emulsificación se completa cuando una gota es colocada sobre la superficie de un baño frío y permanece intacta.
- También prepare el constituyente a una concentración igual en aceite sin el complemento auxiliar de Freud.

c) Extractos líquidos de aceites vegetales:

- Mezcle volúmenes iguales de extractos líquidos de aceites vegetales obtenidos de acuerdo con la práctica de extracción mencionada en este trabajo con un volumen igual de complemento auxiliar de Freud.
- También prepare extractos a una concentración igual en agua sin complemento auxiliar de Freud.

Procedimiento

- Rasare la región de los hombros de 10 puercos de Guinea machos, cepa Hartley de 300 a 500 gr para que esta región este libre de pelo y exponga una área de 4 por 6 cm.
- Use 5 puercos de guinea para control positivo y 5 para el material de prueba.
- Sitúe tres puntos de inyección en cada lado de la espina separadas al menos 1.5 cm. de cada sitio para identificarlos. La inyección intradérmica debe hacerse como se indica abajo, con el sitio 1 cercano a la cabeza del animal.

Sitios para material de prueba:

- (1) Sitio 1- 0.1 ml. de auxiliar sin muestra de prueba.
- (2) Sitio 2- 0.1 ml. de muestra de prueba sin auxiliar.
- (3) Sitio 3- 0.1 ml. de muestra de prueba emulsificada con complemento auxiliar.

Sitios para material de control positivo:

- (1) Sitio 1- 0.1 ml. de auxiliar sin muestra de control positivo.
- (2) Sitio 2- 0.1 ml. de muestra de control positivo sin auxiliar.
- (3) Sitio 3- 0.1 ml. de muestra de control positivo emulsificada con complemento auxiliar.

Aplicación local:

- Una semana después de la inyección intradérmica, rasare el área de prueba de los puercos de Guinea.
- Si la muestra de prueba inyectada no es irritante, trate cada área con lauril sulfato de sodio al 10 % (LSS) en vaselina 24 hrs antes de aplicar los parches de prueba.

- Después de las 24 hrs. aplique la muestra de prueba a un parche de 2 por 4 cm. de papel filtro; dependiendo de las características del material de prueba se hacen los siguientes parches:
- Si el material de prueba es un sólido aplique éste con una capa delgada de vaselina a un papel filtro con una concentración del 25 % en peso (asumiendo que ésta concentración no es irritante).
- Si es un líquido o extracto aplíquelo al papel filtro de prueba hasta saturarlo.
- Aplique papel filtro al sitio de inyección de los puercos de Guinea.
- Una vez hecho algunos de los parches se colocan en el área rasurada del animal y se sellan con cinta quirúrgica de 3.75 cm. y se envuelve el dorso con una venda elástica asegurándose con cinta quirúrgica. Deje colocado por 48 hrs. Estos mismos pasos se realizan con la substancia de control positivo.

Nota 1. Si la concentración final del supuesto compuesto alergénico provoca ulceraciones, necrosis, o toxicidad sistemática, use la concentración máxima tolerable como sigue: de los líquidos, use concentraciones que no causen a los animales de prueba irritación excesiva o deterioro de la salud en general.

- Para líquidos miscibles en aceite, diluya con vaselina si es necesario.
- Para líquidos miscibles en agua, diluya con agua si es necesario.

Estimulación:

- Realice la inducción ya descrita por dos semanas
- Al término de las dos semanas de inducción rasure un flanco de cada animal con un área de 5 por 5 cm.
- Una vez terminada la inducción haga los mismos parches ya descritos anteriormente y colóquelos en el área de prueba
- Selle la muestra y el papel filtro con cinta quirúrgica y venda elástica de la misma forma que se describió arriba.
- Deje las muestras de esta forma por 24 hrs.
- Estos mismos pasos se realizan para el control positivo.

Interpretación de los resultados:

- Lea los sitios estimulados una hora después de remover los parches, y a las 24 y 48 hrs. Clasifique cada sitio para eritema y edema de acuerdo con la tabla 1.
- Prepare una lista tabulada de las reacciones a 1, 24, y 48 hrs.
- Si algún animal muestra una reacción a las 24 y 48 hrs mayor o igual a dos para eritema y edema debe ser considerado sensible.
- Valore la alergia del material de prueba de acuerdo con la tabla 2.
- Si un número significativo (más del 50 %) de los animales muestra una puntuación de reacción de uno, repita la prueba con diez animales adicionales.
- Si el 60 % de los animales en el grupo de control positivo no muestra una reacción de dos o mayor, repita la prueba.

REPORTE

El reporte debe incluir lo siguiente:

- Descripción del material de prueba, nombre genérico, nombre del producto y número de lote.
- Método de preparación, es decir; extracción líquida usada y forma de exposición.
- Alguna dilución necesaria debido a las reacciones severas.
- Condiciones generales de la salud del animal.
- Clasificación de eritema y edema para cada animal.
- Valoración de la respuesta sensitiva.

TABLA 1 Criterio de Puntuación para las Reacciones de la Prueba. (33)

Reacción	Descripción	
Puntuación		
Eritema (ER)	Eritema y Escara	
	Sin eritema	0
	Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
	Eritema bien definido (de color rojo pálido)	2
	Eritema de moderado a severo (área bien definida y roja)	3
	Eritema severo (amorado y una leve escara)	4
Edema (ED)	Formación de Edema	
	Sin edema	0
	Edema muy leve (apenas perceptible)	1
	Edema leve (límites de área bien definidos por un levantamiento)	2
	Edema moderado (límites elevados aproximadamente 1 mm)	3
	Edema severo (levantamiento mayor de 1 mm y se extiende más allá del área de exposición)	4

TABLA 2 Rango de la Respuesta de Sensibilización. (33)

% Sensibilizado	Grado	Clasificación
0 a 8	I	No difiere del control
9 a 28	II	leve
29 a 64	III	Moderada
65 a 80	IV	Fuerte
81 a 100	V	Extrema

PRUEBA ESTÁNDAR PARA EVALUAR EXTRACTOS DE MATERIALES POR INYECCIÓN INTRACUTÁNEA EN CONEJO.

(36)

INTRODUCCIÓN

Esta práctica puede ser usada para estimar la biocompatibilidad de los materiales usados en aparatos médicos. Es una prueba toxicológica aguda diseñada para detectar sustancias lixiviadas que pueden ser dañinas.

Los líquidos inyectados en los conejos son obtenidos por medio de la práctica de extracción mencionada en este trabajo en las pruebas fisicoquímicas auxiliares o para mayor información consultar la referencia (27), los medios de extracción usados pueden ser salinos, aceites vegetales u otros líquidos que simulen fluidos corporales humanos.

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

El extracto líquido se prepara de acuerdo con la práctica de extracción mencionada en la sección de las pruebas fisicoquímicas auxiliares. Los medios de extracción son salinos ó aceites vegetales, sin embargo otros medios de extracción pueden ser empleados. El extracto líquido es inyectado en conejos y los animales son observados a intervalos regulares de 72 horas para eritema, edema, y necrosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Lleve a cabo la práctica de extracción. De este procedimiento resultan: (1) un extracto líquido del material de prueba y (2) un extracto líquido blanco sin material lixiviado (de control). Estos extractos líquidos deben ser inyectados en los animales antes de 24 horas. Si no se usan inmediatamente registre las condiciones de almacenaje.
- Un día antes de la preparación de los extractos (no más de 24 horas), rasure la piel de la espalda de 2 conejos saludables tipo albino variedad Nueva Zelanda a ambos lados de la columna vertebral, sobre un área de prueba suficientemente grande, los conejos no deben haber sido usados en ninguna otra prueba.
- Evite el trauma y la irritación mecánica en la piel de los conejos.
- Remueva el pelo cortado por medio de un afeitador.
- Puede usar un agente depilador que no cause irritación en la piel en lugar de una rasuradora.
- Limpie la piel ligeramente con alcohol diluido y seque la piel antes de la inyección.
- Los animales deben estar en condiciones de bioterio durante la prueba, los conejos deben ser alimentados normalmente con comida apropiada y agua potable.
- Coloque a los conejos en jaulas individuales, una para cada conejo expuesto al los extractos líquidos (de prueba y de control).
- Los conejos con cicatrices o heridas no son apropiados para esta prueba.
- Use jeringas estériles de 2 ml de volumen, con una precisión no menor de ± 0.10 ml y agujas con un calibre de 21 a 26.

- Agite cada extracto líquido vigorosamente antes de la salida de cada dosis de inyección, para asegurar una distribución de la sustancia extraída. Si el extracto líquido contiene partículas en suspensión registre en el reporte de los resultados.
- Inyecte intracutáneamente 0.2 ml del extracto líquido de prueba en 10 sitios diferentes sobre un lado de la columna vertebral de cada conejos.
- Similarmente en otros cinco sitios al lado contrario donde inyectó el líquido de prueba, inyecte en cada conejo 0.2 ml del correspondiente extracto líquido blanco (control).
- Examine los sitios inyectados a las 24, 48, y 72 horas después de la inyección, para observar algunas evidencias de reacción del tejido, como por ejemplo: eritema, edema, y necrosis. Para facilitar el examen, limpie ligeramente con alcohol diluido y rasure la piel en caso de que haya crecido el pelo, si es necesario.
- Estime la reacción del tejido para los diez sitios de la muestra y los cinco sitios del extracto blanco en cada período de observación, para cada tipo de reacción del tejido. La escala de índices para eritema y edema son dados en las tablas 1 y 2.

Interpretación de los resultados:

- Un extracto de prueba es clasificado como no tóxico, cuando la reacción del tejido a los extractos de prueba y blancos son similares para todos los períodos de observación, es decir que no haya evidencia de eritema y edema.
- Repetición de la prueba: Si algún conejo tiene alguna reacción tóxica en el tejido con el extracto de prueba, de moderada a severa y otros no la tienen, repita la prueba usando extractos frescos en tres conejos más. El extracto de prueba es clasificado como no tóxico, cuando en la repetición del experimento la respuestas del tejido a éste no son biológicamente diferentes a las del extracto líquido blanco (de control).
- La repetición de la prueba requiere que el procedimiento de extracción sea hecho por segunda vez.

REPORTE

- Describa la muestra que fue extraída, incluyendo nombre genérico, nombre comercial, código de manufactura, número de catálogo, fecha de manufactura, formulación, procedimiento de fabricación o procedimientos que sean apropiados etc. Describa el medio de extracción y las condiciones de la extracción (temperatura y tiempo).
- Reporte los marcadores para cada tipo de reacción del tejido (eritema y edema) en cada período de observación para los extractos de control y de prueba.
- Si una re-prueba fue hecha, reporte los datos para esta prueba.

TABLA 1 Rango de Severidad para Eritema. (36)

Severidad de Eritema	Rango
Numérico	
Sin eritema	0
Eritema muy leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema de moderado a severo	3
Eritema severo (amorado) hasta la formación de escara leve (daño intenso)	4

TABLA 2 Rango de Severidad para Edema. (36)

Severidad de Edema*	Rango
Numérico	
Sin edema	0
Edema muy leve (apenas perceptible)	1
Edema leve (límites de área definidos por un levantamiento)	2
Edema moderado (área elevada aproximadamente 1mm)	3
Edema severo (área elevada mayor de 1 mm y extendida más allá del área de la inyección)	4

*El edema es tejido inflamado. La inflamación es provocada por la inyección que contiene un medio con una sustancia lixiviada de algún material de prueba, el cual es el puede provocar una reacción de edema y no el medio de extracción.

PRUEBA ESTÁNDAR PARA EVALUAR EXTRACTOS DE MATERIALES POR INYECCIÓN SISTÉMICA EN RATÓN. (37)

INTRODUCCIÓN

Esta práctica es una prueba de toxicidad aguda para detectar sustancias lixiviadas de materiales usados en aparatos médicos. Los líquidos inyectados en el ratón son obtenidos por medio de la práctica de extracción mencionada en este trabajo en la sección de pruebas fisicoquímicas auxiliares, para mayor información consultar la referencia (27), los medios de extracción pueden ser salinos, aceites vegetales u otros líquidos que simulen fluidos corporales humanos.

Se describen dos procedimientos: método A por inyección intravenosa, y método B por inyección intraperitoneal.

Esta prueba es una de las diferentes prácticas desarrolladas para estimar la biocompatibilidad de materiales usados en aparatos médicos. Es una prueba toxicológica aguda diseñada para detectar la presencia de sustancias lixiviadas que pueden ser dañinas.

Esta prueba puede no ser apropiada para todos los tipos de aplicación de implantes. El usuario es advertido para que considere lo apropiado del método en vista de los materiales probados, sus aplicaciones potenciales y las recomendaciones contenidas en la tabla dada en la introducción de este trabajo o para mayor información consultar la referencia (35).

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

El extracto líquido es preparado de acuerdo con la práctica de extracción mencionada en la sección de las pruebas fisicoquímicas auxiliares. Los medios de extracción son salinos, aceites vegetales, etc. El extracto líquido es inyectado en el ratón y los animales son observados en intervalos regulares por 72 hrs. para observar reacciones de sobrevivencia, toxicidad, etc.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Use ratones tipo albino, saludables, que no hayan sido empleados previamente en algún otro experimento, con un peso entre 17 y 23 gr.
- Los ratones deben estar en condiciones de bioterio. La edad, el sexo y el peso deben ser registrados y reportados. Todos los ratones para cada medio de extracción deben ser de la misma fuente. Por cada medio de extracción, son usados un mínimo de 10 ratones en la prueba.
- Durante la prueba los ratones deben ser alimentados normalmente con comida apropiada y agua potable.
- Use una jaula por cada 5 ratones expuestos a un extracto líquido. Cada ratón debe ser identificado por medio de las marcas usadas por el técnico del bioterio y ésta identificación debe ser registrada. Los machos y las hembras deben estar separados y sus jaulas deben ser colocadas de una manera adecuada para prevenir la transferencia accidental de heces, camas de paja u otro material de jaula a jaula.

- Obtenga las muestras de control y de prueba por medio de la práctica estándar de extracción mencionada en la sección de pruebas fisicoquímicas auxiliares en este trabajo.
- La muestra de un material expuesto al procedimiento de extracción da como resultado por cada medio de extracción: (1) una muestra de extracto líquido, y (2) un blanco de extracto líquido que se utiliza como prueba. Estos extractos líquidos son inyectados en los animales de prueba dentro de 24 hrs, que es el tiempo de vida media del extracto. Al final del procedimiento de extracción, si no se usa inmediatamente el extracto registre las condiciones de almacenaje y el pH de la solución.

PROCEDIMIENTO

Método A, intravenoso:

- Use jeringas estériles, de 3 ml de volumen, con una precisión de ± 0.10 ml, con agujas con un calibre de 25 a 27½
- El extracto líquido debe ser preparado con un medio de extracción salino, propio para inyección intravenosa.
- Agite el extracto dentro de la jeringa antes de cada inyección. Si el extracto líquido contiene partículas en suspensión, registre y reporte las observaciones.
- Del extracto líquido preparado se utilizan 50 ml/kg. de peso corporal de cada ratón, y se suministra a una velocidad constante no mayor de 0.1 ml/seg. Si es usado un extracto líquido hipotónico o hipertónico, entonces la velocidad de la inyección es ajustada proporcionalmente.
- El extracto líquido acuoso debe ser nominalmente isosmótico. Si no lo es, entonces se puede agregar cloruro de sodio diluido en agua destilada a los extractos .
- Para cada medio de extracción use 10 ratones, 5 para el extracto líquido muestra y 5 para el extracto líquido blanco (de control). Antes de la inyección pese todos los ratones y registre sus pesos. Use un sistema de marcaje para identificar cada ratón individualmente dentro de cada grupo de 5.
- Inyecte la cantidad predeterminada del extracto líquido muestra en la vena de la cola de cada uno de los 5 ratones. Inyecte el extracto líquido blanco en el mismo lugar en los otros 5 ratones. El uso de agua tibia ó caliente, una lámpara de calor, etc. puede ayudar a dilatar las venas de la cola para facilitar la inyección.
- Observe inmediatamente a todos los animales después de la inyección, de nuevo a las 4, 24, 48, y 72 hrs. respectivamente después de la inyección, para los síntomas de una ligera, moderada, o marcada toxicidad o muerte (tabla 1). Registre las observaciones. Mida y registre los pesos corporales de todos los animales a las 24, 48, y 72 hrs. después de la inyección.

Método B, intraperitoneal:

- Use jeringas estériles, de 3 ml de volumen, con una precisión de ± 0.10 ml, con agujas de un calibre de 21 a 26
- El extracto líquido es preparado de un medio de extracción de aceite vegetal o suero fisiológico. Sólo en casos donde el material sea polar se pueden utilizar medios salinos, propios para inyección intraperitoneal.

- Agite el extracto dentro de la jeringa antes de cada inyección. Si el extracto líquido contiene partículas, registre y reporte las observaciones.
- La dosis del extracto líquido es de 50 ml/kg. del peso del cuerpo para cada ratón.
- Para cada medio de extracción use 10 ratones, 5 para el extracto líquido muestra y 5 para el extracto líquido blanco (de control). Antes de la inyección pese todos los ratones y registre sus pesos. Use un sistema de marcaje para identificar cada ratón individualmente dentro del grupo de 5.
- Inyecte la cantidad predeterminada del extracto líquido de prueba intraperitonealmente en cada uno de los 5 ratones. Inyecte el extracto líquido blanco de la misma manera en los otros 5 ratones.
- Observe a todos los animales inmediatamente después de la inyección, de nuevo a las 4, 24, 48, y 72 hrs, respectivamente, para los síntomas de ligera, moderada, o marcada toxicidad o muerte (tabla 1). Registre las observaciones. Mida y registre los pesos corporales de todos los animales a las 24, 48 y 72 hrs. después de la inyección.

Interpretación de los resultados:

- Si durante el periodo de observación de 72 hrs. ninguno de los animales tratados con el extracto líquido de prueba muestran una reacción biológica mayor que la de los animales tratados con el extracto líquido blanco o de control, la muestra de prueba se puede clasificar como no tóxica y satisface los requerimientos de la prueba.
- Si dos o más animales muestran algunos síntomas marcados de toxicidad o muerte con el extracto de prueba, entonces las muestras no satisfacen los requerimientos de la prueba y se clasifican como tóxicas.
- **Repetición de la prueba-** Si algún animal inyectado con el extracto de prueba muestra señales leves de toxicidad, y nada más un animal muestra síntomas marcados de toxicidad o muerte, repita la prueba usando 2 grupos de 10 ratones cada uno. También si se observa un decremento en el peso corporal de todos los animales del grupo, sin otros síntomas de toxicidad, se requiere una repetición de la prueba usando 2 grupos de 10 ratones cada uno. En esta repetición de la prueba, los extractos de prueba se clasifican no tóxico, si ninguno de los animales inyectados con éste, muestran una reacción mayor que la observada en los animales inyectados con el extracto blanco o de control.
- La repetición de la prueba requiere que el procedimiento de extracción vuelva a ser hecho nuevamente.

REPORTE

- Describa la muestra que fue extraída, incluyendo, nombre genérico, nombre comercial, código de manufactura, número de catálogo, fecha de manufactura, fórmula, procedimientos de fabricación o procesos, etc., que sean apropiados.
- Describa el medio de extracción y las condiciones de la extracción (temperatura y tiempo).
- Reporte el número de ratones usados, el peso de cada ratón, sexo y edad, y si el ratón fue expuesto al extracto muestra o al extracto blanco.
- Reporte si fue necesario repetir la prueba y las razones por las cuales se repitió.

- Por cada ratón usado, incluyendo los usados en una repetición de prueba, reporte las señales clínicas de la respuesta al extracto: mencionando si en la reacción hubo o no una leve, moderada, ó marcada toxicidad o muerte. Esto se aplica a todos los ratones, tanto a los inyectados con el extracto líquido muestra y con el extracto líquido blanco.

Tabla 1 Respuesta a la Prueba de Inyección Sistémica. (37)

Respuesta	Descripción
Normal, sin síntomas	El ratón no exhibe síntomas físicos adversos después de la inyección.
Leve	El ratón exhibe síntomas leves pero no importantes de hipoquinesia, disnea, o irritación abdominal después de la inyección.
Moderada	El ratón exhibe evidencia definida de irritación abdominal, disnea, ptosis, o diarrea, después de la inyección. (El peso usualmente baja de 15 a 17 gr).
Marcada	El ratón exhibe postración, cianosis, temblores, o severos síntomas de irritación abdominal, diarrea, ptosis, o disnea después de la inyección. (Extrema pérdida de peso; peso usualmente menor de 15 gr).
Muerte o expiración	El ratón muere después de la inyección

PRUEBA ESTÁNDAR PARA PROBAR MATERIALES IMPLANTADOS EN UN PERIODO CORTO.(39)

INTRODUCCIÓN

Esta práctica junto con otras pruebas biológicas apropiadas, pueden ser usadas en la estimación de la biocompatibilidad de materiales que se proponen usar en la fabricación de aparatos para aplicación médica. Esta práctica da la gufa para realizar pruebas a corto plazo con materiales (tanto densos como porosos) y determinar cómo afectan éstos al tejido animal donde son implantados.

Este protocolo experimental no está diseñado para proporcionar una estimación de la toxicidad sistémica, carcinogenicidad, teratogenicidad o mutagenicidad del material.

La biocompatibilidad se da cuando el material implantado no modifica las condiciones físicoquímicas del medio interno del organismo, no alterando ni al tejido adyacente, ni órganos dentro del animal huésped.

Para conocer la respuesta del tejido a un material y considerarlo apropiado, se compara con materiales de control que generalmente se usan para implantes.

Los materiales de control para esta prueba deben ser algunas de las aleaciones metálicas especificadas en las referencias (24,28,30), o si se utiliza alguna cerámica se puede utilizar óxido de aluminio de alta densidad y pureza descrita en la referencia (26), para el caso de los polímeros se puede utilizar el plástico de control negativo de la USP (policetileno de ultrapeso molecular), para mayor información consultar la referencia (57), los cuales son estandarizados en base a la experiencia de la aceptabilidad en el periodo largo. Los controles generalmente producen una leve reacción celular y cicatrización aceptada por el hospedero de prueba, esto ha sido observado y reproducido en varios laboratorios.

Todos los implante de control y de prueba deben tener las siguientes características físicas, como son: la forma, densidad, dureza y acabado de superficie apropiados, ya que, pueden ser rechazados o pueden provocar una respuesta adversa en el tejido.

Esta práctica sirve como un rápido procedimiento de escrutinio para determinar la aceptabilidad de materiales candidatos ha ser implantados. Esta será llevada a cabo antes de usar la prueba de periodo largo, propuesta también en este trabajo.

Esta práctica no es apropiada para todos los tipos de aplicación de implantes. Se advierte al usuario para que considere el método apropiado, en vista de los materiales que ya se han probado.

Los materiales candidatos porosos y densos son adecuados para esta práctica, sus efectos sobre el tejido son comparados con materiales de control densos.

Seguramente, hay grandes diferencias entre materiales porosos y densos; sin embargo, los controles negativos porosos no están disponibles todavía. Por lo tanto, pueden ser comparados con otros ya aceptados médicamente como controles negativos densos.

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

Bajo condiciones asépticas, tiras de prueba del material a probar y de un material de control son insertadas en el músculo paraventral de los animales. Después de un tiempo los animales son sacrificados por medio de anestesia. Las reacciones del tejido para los implantes del material de prueba durante el periodo de tiempo, agudo o subcrónico de recuperación, son comparados con las reacciones del tejido para los materiales de control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hospederos de prueba y sitios

- Pueden ser usados como hospederos de prueba los conejos, las ratas, u otros animales. Los siguientes procedimientos son descritos para conejos, que generalmente son usado para este procedimiento. El procedimiento puede ser adaptado con pocas alteraciones para otros hospederos de prueba.
- Use conejos tipo Nueva Zelanda sanos como hospederos de prueba, que pesen más de 2.5 Kg y en los cuales los músculos paraventrales sean suficientemente largos para permitir la implantación de las tiras de prueba.
- El músculo paraventral localizado en el dorso al lado de la columna vertebral se usa como sitio de prueba de modo que se puedan implantar las muestras.
- Preparación de conejos: rasure la piel de los animales el día de la prueba o 20 horas antes a ambos lados de la columna vertebral, removiendo cuidadosamente el pelo cortado

Selección de materiales de control

- Seleccione materiales de control negativo que se ha demostrado que provocan una reacción mínima en el tejido, como son las aleaciones metálicas especificadas en las referencias 24, 28, 30, o el material polimérico de control negativos especificada en la referencia 57, el óxido de aluminio también puede ser usado como un material cerámico de control negativo especificado en la referencia (26).
- El uso de un control positivo puede ayudar a clarificar y a comparar el carácter de la respuesta del tejido del material de prueba elegido.

Fabricación de las muestras de control y de prueba:

- Cada implante debe ser fabricado acabado y limpiado en su superficie de una manera apropiada, si se proyecta utilizar en seres vivos. El implante de un metal denso debe tener una acabado de superficie, tal como lo especifica la practica de superficie mencionada en este trabajo en la sección de las pruebas fisicoquímicas auxiliares, o para mayor información revisar la referencia (25). La medida, forma y superficie de implantes de prueba y de control deben ser tan similares como sea posible.
- Los implantes deben medir en el rango de 1 por 10 mm (0.04 por 0.4 pul) a 3.2 por 12 mm (0.125 por 0.5 pul). Estos pueden ser de corte transversal o cuadrados. Los ejes de las tiras deberán ser tan lisas como sea posible para prevenir un trauma mecánico adicional sobre los sitios de implante.

Periodo de implantación

- La colocación de todos los implantes, dentro de algún animal debe hacerse en la misma sesión quirúrgica.
- La evaluación del implante debe ser llevada a cabo entre 7 y 30 días, de modo que se dé una caracterización exacta, tanto del material de prueba como de control, durante el periodo agudo y subcrónico de recuperación del tejido durante la respuesta al implante. Tres animales se usarán para cada periodo, por ejemplo: 3 a 7 días, 3 a 30 días, y opcionalmente se puede incluir un grupo de 3 a 90 días, ya que algunos investigadores han encontrado que extendiendo la prueba al incluir un tercer grupo de animales manteniéndolos hasta 90 días, puede proporcionar datos adicionales sobre la respuesta del hospedero al material de prueba implantado.

Procedimiento de implantación

- El método recomendado para implantación; es por medio de aguja hipodérmica o trocar hipodérmico, previamente se hace una incisión de tamaño apropiado para las muestras de control y de prueba, para permitir el paso del diámetro de la aguja o trocar hipodérmico. Si ésta técnica no es conveniente, pueden ser usadas otras técnicas de implantación que se juzguen apropiadas.
- Preparación de las tiras de prueba. Coloque las tiras de prueba estériles dentro de la aguja hipodérmica o trocar, protegiendo la cánula y el centro con una cubierta apropiada. Cuando se usa un trocar, las tiras de prueba e instrumentos para la implantación pueden ser esterilizados por separado.
- Si se usan agentes esterilizantes como el óxido de etileno permita un apropiado tiempo de aireación adecuado, ya que éste puede ser tóxico y puede influir en los resultados de nuestra prueba.
- Si los materiales probados son más duros que los materiales de los cuales están hechos los instrumentos manuales, hay el daño de la contaminación de la superficie de las piezas de prueba por el uso de los instrumentos, los cuales pueden perturbar los resultados (por ejemplo, piezas de prueba de cerámica implantada con instrumentos de metal etc.).
- Manipule las piezas de prueba y los instrumentos de implante por medio de telas y plásticos suaves.
- Implante cuatro tiras de las muestras en el músculo paraventral (thh) a uno de los lados de la espina dorsal de cada conejo, entre 2.5 a 5 cm de la línea media y paralela a la columna vertebral, y apartadas casi 2.5 cm una de otra. De manera similar, implante cuatro tiras de muestras de control en el músculo opuesto de cada animal.
- En casos donde pueda esperarse que el control negativo provoque más que una mínima respuesta use dos tiras de prueba de este control negativo. Implante dos muestras de control adicional, compuestas de un material conocido que provoque una mínima reacción al tejido, en un sitio opuesto a las muestras de prueba.
- Con el trocar de implantación inserte la pieza de prueba después de retirar el punto central e inserte un estilete estéril en la aguja para sujetar la muestra en el tejido mientras se retira la cánula.
- Si se observa sangrado excesivo después de la implantación de la pieza de prueba, coloque un duplicado de la muestra de prueba en otro sitio. Cierre la inserción después de que

complete la implantación. Use tantos animales como sea necesario para permitir la implantación de 12 muestras de prueba y 12 controles para cada intervalo de sacrificio.

Cuidado postoperatorio

- Observe cuidadosamente cada animal durante el periodo de prueba y reporte cualquier anomalía.
- Si un animal muere antes de la fecha de sacrificio, se hace la necropsia para determinar la causa de la muerte. Si la causa de muerte está relacionada al procedimiento o al material de prueba. Incluya el dato del animal en el reporte de la prueba.
- Una prueba aceptada es aquella en la cual dos animales de cada tres sobreviven a cada periodo de prueba. En el caso en que se elijan otros hospederos de prueba, serán elegidas 8 tiras de prueba y 8 de control, por cada periodo de prueba.
- La infección o daño en el sitio de implante en algún animal invalida los resultados, reemplace al animal con otro.

Sacrificio y recuperación de implantes

- Sacrifique los animales con un agente anestésico apropiado. Antes de la anestesia rasure el área de implante y límpiela apropiadamente.
- El sacrificio de los animales se hará de acuerdo con los intervalos previamente determinados.
- Durante el sacrificio, registrar cualquier anomalía importante en cuanto a color o consistencia que se observe en los alrededores del tejido donde se colocó el implante.
- Examine microscópicamente el área del tejido alrededor del punto central de cada pieza de prueba implantada. Use una lente de aumento si es necesario.

Observaciones histopatológicas para la prueba aguda (7 días) y prueba subcrónica (30 y 90 días):

- Remover cada implante (de control y de prueba) con una envoltura intacta de tejido adyacente. La muestra de tejido deberá incluir una capa de cuatro milímetros de grueso del tejido alrededor del implante, si es menos de cuatro milímetros repórtelo.
- Procese el tejido extraído para estudios histopatológicos y para otros estudios que sean apropiados.
- Corte la muestra de tejido en muestras apropiadas para cada estudio.
- Registre la apariencia del implante y del tejido adyacente a éste, y observe la consistencia y el color, ya sea viendo a simple vista, con una lupa o al microscopio estereoscópico.
- Si es posible, procese la muestra con el implante en el mismo sitio. Esto permite identificar más fácilmente el sitio de implante y disminuye la distorsión durante la fijación.
- Después de la fijación remueva el material implantado. Si un implante es removido de su sitio en el tejido, reporte la cantidad de tejido removido con el implante.
- Procese la muestra de tejido para técnicas histológicas, en las cuales se incluye la inclusión, corte y la tinción.
- Prepare uno o dos bloques de tejido adyacente a cada sitio de implante.
- Las secciones histológicas pueden ser preparadas usando un microtomo convencional.

- Para materiales porosos implantados, la calidad y la cantidad del tejido crecido interiormente en ellos puede ser examinado usando las secciones preparadas apropiadamente.

Cédula histopatológica

- Procesar al menos dos muestras del tejido microscópico de cada muestra de implante de control y de prueba, incluyendo una envoltura del tejido adyacente del implante para obtener una adecuada estimación histopatológica de la reacción del tejido.
- Si las tinciones son necesariamente dañinas, prepare bloques adicionales de tejido, capas o ambos y haga observaciones apropiadas.
- Observaciones histopatológicas- compare y reporte la cantidad de tejido adyacente que reaccionó al implante de prueba, con el tejido adyacente al implante de control, en cuanto al grosor de la cicatriz, presencia de inflamación, tipos celulares no presentes normalmente en el sitio, presencia de partículas y cualquier otra indicación de una interacción entre el material y el tejido.

REPORTE

- El reporte debe incluir todos los detalles de la caracterización del implante: medida, fabricación, condiciones, (incluyendo lavado, manejo y técnicas de esterilización empleadas), procedimientos para la implantación y recuperación de implantes. Las características de los materiales de control deben ser reportados desde su composición química, mecánica, condiciones térmicas y acabado. Todos los detalles de algún procedimiento especial (tal como una inusual o única dieta de comida para los animales de prueba) debe ser incluida en el reporte.
- Debe incluir las observaciones de cada control e implante de prueba en cada intervalo de tiempo, también la apariencia del tejido adyacente en el cual estuvieron los implantes.
- Debe tener las observaciones de cada examen histopatológico.

PRUEBA ESTÁNDAR PARA LA ESTIMACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD DE BIOMATERIALES (NO POROSOS) PARA IMPLANTES QUIRÚRGICOS CON RESPECTO AL EFECTO SOBRE MÚSCULO Y HUESO.(42)

INTRODUCCIÓN

Esta práctica proporciona un protocolo experimental para probar y estimar el efecto que produce un material implantado en el tejido animal, con materiales no porosos y no absorbentes. El protocolo experimental no está diseñado para proporcionar una estimación útil de la toxicidad sistémica, carcinogenicidad, teratogenicidad, o mutagenicidad del material. Es aplicable sólo a los materiales con aplicaciones proyectadas en humanos a corto plazo, donde los materiales residirán en hueso o tejido blando a lo largo de 30 días y permanecerán inabsorbidos.

Esta práctica sigue un protocolo de prueba para comparar la respuesta del tejido local provocada por materiales de prueba, con la respuesta provocada por materiales de control que generalmente se usan para la fabricación de aparatos quirúrgicos.

Los materiales de control para esta prueba deben ser algunas de las aleaciones metálicas especificadas en las referencias (24,28,30), o si se utiliza alguna cerámica se puede utilizar óxido de aluminio de alta densidad y pureza descrita en la referencia (26), para el caso de los polímeros se puede utilizar el plástico de control negativo de la USP (polietileno de ultrapeso molecular), para mayor información consultar la referencia (57), los cuales son estandarizados en base a la experiencia de la aceptabilidad en el periodo largo. Los controles generalmente producen una leve reacción celular y cicatrización aceptada por el hospedero de prueba, esto ha sido observado y reproducido en varios laboratorios.

Esta práctica está basada en las técnicas de investigación utilizadas por Cohen y por Laing, Ferguson y Hodge a principios de los 60's. Estos estudios involucran la implantación de cilindros de metal en el músculo paravertebral de conejos. La reacción biológica a los cilindros fue descrita como el grueso de la membrana fibrosa o la cápsula formada junto al implante. El grueso de la cápsula y la presencia de células inflamatorias fueron usadas como una medida del grado de reacción adversa al material de prueba. (42)

Para comparar algunas reacciones específicas este método utiliza ratas, perros y conejos.

Las muestras de prueba cilíndricas con puntas redondeadas son usadas para evitar reacciones biológicas asociadas con las formas de las terminaciones u otras variaciones de la forma de la muestra.

En 1978, fue publicada otra práctica como un documento paralelo de prueba para material polimérico. En ésta los métodos son esencialmente los mismos, la ampliación se ha hecho hasta incluir las pruebas hechas en metales, materiales poliméricos y cerámicos.

Las aleaciones de acero inoxidable, cobalto-cromo y titanio son usadas como materiales de referencia para la respuesta biológica, estos materiales han sido bien caracterizados por su extensivo uso en la investigación. La respuesta a estos materiales no es definida como compatible, sino, es usada como referencia contra las reacciones para otros materiales.

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

Esta práctica describe la preparación de implantes, el número de implantes y hospederos de prueba, sitios de prueba, cédula de exposición, técnicas de esterilización de implantes, métodos de recuperación de implantes y examen del tejido de cada sitio de prueba. También son proporcionados criterios histológicos para evaluación de la reacción del tejido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hospederos y sitios de prueba

- Las ratas han sido aceptadas por su resistencia, un ejemplo es la cepa Fisher 344 o cualquier otra cepa. También pueden ser usados como hospederos de prueba los conejos de Nueva Zelanda y los perros para obtener una respuesta del tejido blando a implantes. (49)
- Se sugiere que las ratas se seleccionen por edad y sexo.
- El hueso sacro-espinal, el paralumbar, los músculos glúteos y el fémur o tibia pueden servir como sitios de prueba para los implantes. Sin embargo, el mismo sitio puede ser usado para probar implantes en todas las especies animales.
- La tabla 1, nos muestra el número mínimo de animales que requieren para la prueba, y una cédula para tomar datos de la necropsia de los animales.

Muestras de implantes

- Fabricación- cada implante debe ser hecho de forma cilíndrica con terminaciones hemisféricas. Si las terminaciones no son hemisféricas, se debe reportar. Cada implante debe ser fabricado, acabado y limpiado en su superficie de una manera apropiada, tal y como se usa para su aplicación en humanos de acuerdo con la práctica de superficie que se menciona en este trabajo en la sección de pruebas fisicoquímicas auxiliares o para mayor información consultar la referencia (25).
- Las muestras pueden ser hechas de metales, cerámicas y polímeros.

Medidas sugeridas y formas de implantes para inserción en músculo:

- Para ratas - los implantes deben ser cilíndricos de 1 mm de diámetro por 2 mm de longitud.
- Para conejos- los implantes deben ser cilíndricos de 1 mm de diámetro por 10 a 15 mm de longitud.
- Para perros - los implantes deben ser cilíndricos de 6 mm de diámetro por 18 mm de longitud.
- Si los problemas de fabricación impiden preparar muestras de 1 mm de diámetro, las muestras alternativas serán de 2 mm de diámetro por 6 mm de longitud para ratas y 4 mm de diámetro por 12 mm de longitud para conejos. Si estas dimensiones alternativas son usadas, deberá ser reportado

Medidas y formas de implantes para inserción en hueso:

- Sólo se usan para conejos y perros, debido a la dificultad de implantar muestras en las ratas por el tamaño de los huesos.
- Para conejos- los implantes deben ser cilíndricos de 2 mm de diámetro por 6 mm de longitud.

-Para perros- los implantes deben ser cilíndricos de 4 mm de diámetro por 12 mm de longitud.

-Si la longitud de los implantes de hueso necesariamente deben ser menos grandes, debe ser reportado.

Número de muestras de prueba e implantes de control

Nivel muscular:

- En cada rata, debe haber 2 implantes; uno de control y uno de prueba.

- En cada conejo, debe haber 6 implantes; 4 de prueba y 2 de control.

- En cada perro, debe haber 12 implantes; 8 de prueba y 4 de control.

Condiciones que deben de tener las muestras antes de ser implantadas:

- Remover todos los contaminantes de la superficie con solventes apropiados y enjuagar todos los implantes de prueba y de control en agua destilada antes de la esterilización. Se recomienda que el material implantado sea procesado y limpiado cuidadosamente usando siempre técnicas asépticas.

- Limpiar, empaquetar, y esterilizar todos los implantes de la forma más aséptica posible

- Después de la preparación final y la esterilización, el manejo de los implantes de control y de prueba se debe hacer con mucho cuidado para asegurar que éstos no se maltraten, dañen o contaminen de alguna manera antes de la inserción.

- Reporte todos los detalles de las condiciones.

Periodo de implantación

- Inserte todos los implantes en cada animal en la misma sesión quirúrgica para que los periodos de implantación corran normalmente. Los periodos de implantación son: de 52 semanas para ratas y conejos; 104 semanas para perros, con sacrificios intermedios de 12, 26, y 52 semanas, para ratas y conejos y de 12, 26, 52, 104, para perros.

Implantación (A nivel muscular):

- Coloque los materiales de implante en el músculo paravertebral en las ratas, conejos y perros adultos, de manera que éstos estén en contacto con el tejido muscular.

- Introduzca los materiales de implante en los conejos y ratas usando técnicas estériles. Las agujas Luer-Lock pueden ser usadas para implantar los materiales en los músculos paravertebrales a lo largo de la espina dorsal. En las ratas inserte un implante de control negativo a un lado de la espina dorsal y un material de implante de prueba en el otro lado. En los conejos implante un material de control negativo a cada lado de la espina dorsal e implante dos materiales de prueba en cada lado de la espina dorsal.

- Introduzca los materiales de implante en los perros empleando la técnica en la cual, se hace un lugar de implantación en el músculo, usando un hemoestato* para separar las fibras musculares. Inserte el implante usando unos forceps con extremos plásticos o alguna herramienta que no sea abrasiva para que no provoque ningún daño al implante.

- No inserte más de 12 materiales de implante en cada perro.

Implantación en hueso (Fémur):

- Exponga la corteza lateral de cada fémur de conejo y taladren tres orificios de 1/16 de pulgada (1.6 mm) a través de la corteza lateral usando la técnica y los instrumentos apropiados para el procedimiento.
- Para los perros, haga los orificios de 1/8 de pulgada (3.2 mm) de diámetro; hacer 6 orificios en cada fémur. En cada uno de estos orificios insertar cada uno de los implantes por medio de la presión de los dedos. Entonces cerrar la herida.
- Debe tenerse precaución para minimizar el movimiento del implante en el tejido para no provocar ninguna lesión y obtener el resultado deseado.

Cuidado postoperatorio:

- Observar cuidadosamente cada animal durante el periodo de prueba y reportar cualquier anomalía.
- La infección o lesión del sitio del implante de prueba puede invalidar los resultados. La decisión para reemplazar al animal dependerá del diseño de la práctica o estudio.
- Si un animal muere antes de la fecha de sacrificio, debe hacerse la necropsia de acuerdo con lo que se indica abajo, para determinar la causa de la muerte. Se debe incluir el animal en los datos del Prueba si la causa de muerte está relacionada al procedimiento o material de prueba.

Sacrificio y recuperación de implantes:

- Sacrifique a los animales con un método humano en los intervalos enlistados en la tabla 1.
- El inicio de los periodos de necropsia debe ser de 12 semanas porque se asume que se ha realizado previamente la práctica de corto plazo, y se tienen los datos aceptables de implantación para los primeros periodos de 1, 4, y 8 semanas de la prueba de implante de periodo corto.
- En la necropsia, se deben registrar las anomalías macroscópicas de color y de consistencia observadas en el tejido alrededor del implante. Debe removerse cada implante con una envoltura intacta de tejido de alrededor, incluyendo en la muestra del tejido una capa mínima de 4 mm de grueso del tejido que está alrededor del implante. Si la capa es menor a los 4 mm de grueso, repórtelo.
- Observaciones postmortem- Practique la necropsia a todos los animales que son sacrificados o que mueren durante el periodo de prueba, de acuerdo con las prácticas estándar de laboratorio. Establezca las condiciones de salud del animal experimental durante el periodo del prueba y repórtelo.

Procedimiento histológico:

Preparación de muestras de tejido:

- Prepare 2 bloques de cada sitio de implante.
- Procese los bloques de tejido extraído conteniendo cada uno un implante de prueba o un implante de control para el examen histopatológico y para otros estudios apropiados. Corte la muestra a la mitad de extremo a extremo en medidas apropiadas para cada estudio. Registre la apariencia macroscópica del implante y del tejido.

- Si las funciones especiales se juzgan necesarias, prepare bloques de tejido adicionales o placas, ó anbas, y las haga observaciones apropiadas.

Observaciones histopatológicas

- Compare la cantidad de reacción del tejido adyacente al implante de prueba, con respecto al tejido adyacente al implante de control, observando el grueso de la cicatriz, presencia de inflamación u otros tipos de células, presencia de partículas, así como otras indicaciones de la interacción del tejido y los materiales.

Método sugerido para la evaluación de la respuesta del tejido:

- Use el criterio mostrado en la tabla 2, en el cual se muestra un formato donde se evalúa la presencia de algunos elementos celulares con un rango de marca de 0 a 3 .

- El sistema de marcaje de 0 a 3 está basado en el número de elementos celulares de inflamación observados con un alto poder de campo (470x) con el porcentaje de 5 campos. Ejemplo:

Número de elementos	Marcador
0	0
1-5	0.5
6-15	1
16-25	2
26 o más	3

- El grado marcado de necrosis es determinado usando el mismo intervalo de 0 a 3, como sigue:

Grado	Marcador
No presente	0
Mínimamente presente	0.5
Grado ligero de involucrimiento	1
Grado moderado de involucrimiento	2
Grado marcado de involucrimiento	3

- Un intervalo de toxicidad completo de muestras de prueba puede ser dado usando un intervalo de 0 a 4, como sigue:

Intervalo	Marcador
No tóxico	0
Reacción tóxica muy leve	1
Reacción tóxica ligera	2
Reacción tóxica moderada	3
Reacción tóxica marcada	4

- Los patólogos deben usar el sistema de marcador para comparar el control negativo con el material de prueba como una ayuda en su evaluación para todos los periodos de tiempo.

REPORTE

El reporte debe incluir la siguiente información:

- Todos los detalles de la caracterización, fabricación y condiciones (incluyendo lavado, manejo y técnicas de esterilización empleadas) de los implantes.
- Los procedimientos para la implantación y la recuperación de implantes.
- Los detalles de algún procedimiento especial (tal como una inusual o única dieta de alimentación para los animales de prueba).
- Las observaciones de cada implante de control y de prueba también como la apariencia macroscópica del tejido de alrededor en el cual se colocaron los implantes.
- Proporcionar las observaciones de cada examen histopatológico y la evaluación de los histopatólogos en cuanto a la toxicidad del material de prueba.

TABLA 1 INTERVALOS DE SACRIFICIO. (42)

Periodos de necropsia (Semanas después de la inserción de los implantes)	Número de Animales que son sacrificados a la Necropsia		
	Rata	Conejo	Ferret
12 semanas	4	4	2
26 semanas	4	4	2
52 semanas	4	4	2
104 semanas	-	-	2

TABLA 2 Formato para registrar y evaluar histopatológicamente al tejido adyacente al implante. (42)

Animal Número	
Duración del Implante (en semanas)	
Descripción de la Muestra	
Respuesta Total	
Histopatología Número	
Puntuación	0 0.5 1 2 3
Necrosis	
Degeneración	
Inflamación:	
a) Leucocitos Polimorfonucleares	
b) Linfocitos	
c) Eosinófilos	
d) Células Plasmáticas	
e) Macrófagos	
Fibrosis	
Células Gigantes	
Remanentes de Cuerpos Extraños.	
Infiltración de Tejido Adiposo	
Medida Relativa del Área del Tejido que Envuelve el Implante en mm ²	
Estimación de la Toxicidad Histopatológica	

C) PRUEBAS FISICOQUÍMICAS AUXILIARES

PRUEBA ESTÁNDAR PARA EXTRACCIÓN DE PLÁSTICOS O MATERIALES MÉDICOS. (27)

INTRODUCCIÓN

Esta práctica proporciona un método para extracción de plásticos u otros materiales sólidos que se utilizan en aplicaciones médicas (metales, aleaciones, polímeros etc.) en líquidos que simulan en su acción fluidos corporales. Esta práctica proporciona dos métodos de extracción: uno para obtener extractos líquidos para análisis fisicoquímico; y el otro método para obtener extractos líquidos, para determinar su respuesta en un sistema biológico probándolos, ya sea "in vitro" en cultivo de tejidos o "in vivo" en animales. Estos procedimientos de extracción (lixiviación) son parte inicial de varios procedimientos de prueba para la biocompatibilidad de plásticos u otros materiales sólidos.

Esta práctica se puede usar en la evaluación parcial de materiales puros, aleaciones o mezclas que se usan comúnmente en aplicaciones médicas. Esta práctica puede ser usada como un método de referencia para la medición de extractos de aparatos médicos.

Deben ser reconocidas las limitaciones de los resultados de esta práctica, ya que la elección de medios de extracción, tiempo de inmersión y temperatura de la prueba son arbitrarias. La especificación de estas condiciones proporcionan una base para la estandarización y sirven como una guía para comparar la lixiviación de varios materiales sólidos en diferentes medios de extracción.

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

Muestras de medida estándar del plástico o cualquier otro material sólido, son inmersos en volúmenes definidos de líquidos seleccionados (medios de extracción) para el tiempo y temperatura especificada.

Para elegir un material se debe basar en su uso final, de esta forma también se eligen los medios de extracción y una de las combinaciones de tiempo y temperatura para la prueba. Los líquidos de prueba (extractos líquidos) resultantes son guardados en recipientes de vidrio hasta ser usados para la prueba fisicoquímica o biológica. Los líquidos de prueba son guardados en recipientes de vidrio estériles, y deben ser usados en 24 hrs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de extracción

- La siguiente lista de medios de extracción estándar es aceptada para simular los medios constitutivos de los fluidos corporales humanos, éstos se usan dependiendo de la naturaleza polar o no polar de nuestro material de prueba. Las soluciones acuosas deben ser hechas con agua destilada. Los medios de extracción deben de ser:

- Solución de cloruro de sodio, contenido en peso, no menos del 0.85 % y no más del 0.95 % de cloruro de sodio.
- Aceites vegetales.
- Aceite de ajonjolí puro.

- Aceite de semilla de algodón puro.
- Agua para inyección.
- Sueros fisiológicos, etc.

- Limpie todos los recipientes de vidrio que se vayan a usar con una mezcla limpiadora de ácido crómico, ó si es necesario, con ácido nítrico caliente, seguida por prolongados enjuagues con agua corriente y al menos dos enjuagues con agua destilada.
- Antes de usar y dividir la muestra limpie los aparatos de corte por medio de un método apropiado, por ejemplo, limpiando sucesivamente con solventes.
- Limpie todo lo que vaya a tener contacto con la muestra, por medio de un lavado total con detergente y prolongados enjuagues con agua de la llave y al menos dos enjuagues con agua destilada.
- Si se usa el óxido de etileno como el agente esterilizante, proporcione un tiempo adecuado para que se evaporen todos los residuos de éste.
- Se debe de tener cuidado de no contaminar el material estéril que se usara para extraer las porciones de muestra para la respuesta biológica.
- Use un recipiente adecuado para que puedan caber un medio de extracción de 20 ml y alguna de las siguientes medidas de muestra:
 - El área de superficie total de una muestra debe ser equivalente a 120 cm² (18.6 Pul².) con un grueso 0.50 mm. (0.020 Pul.) ó es equivalente con una muestra de 60 cm². (9.3 Pul².) cuando el grueso es mayor que 0.50 mm. (0.020 Pul.).
 - Una alternativa para muestras de intrincada geometría ó muestras gruesas mayores de 1.0 mm. (0.39 Pul.), se puede obtener una muestra de 4 gr. (0.14 onz.) de peso.
 - Una vez cortada la muestra, se debe esterilizar por medio de un método adecuado.
 - Las muestras se deben ajustar en el recipiente de extracción y su área superficial total debe ser totalmente cubierta por el medio de extracción.
 - Pruebe al menos tres porciones de muestra con cada medio de extracción para la respuesta de variabilidad.

Procedimiento de extracción

a) Extracción para respuesta biológica:

- Prepare una serie de cuatro porciones de 20 ml de medio de extracción. Coloque una porción de muestra en cada uno de los tres recipientes; el medio de extracción en el cuarto recipiente servirá como un blanco. Asegúrese de tapar cada recipiente.
- Condiciones de extracción - Emplee una de las siguientes condiciones de acuerdo con los requerimientos especificados. El tiempo que se proporciona es para permitir que el líquido alcance la temperatura de extracción:

37 ± 1 °C (95 ± 1.8 °F) por 120 hrs.

50 ± 2 °C (122 ± 3.6 °F) por 72 hrs.

70 ± 2 °C (158 ± 3.6 °F) por 24 hrs.

121 ± 2 °C (250 ± 3.6 ° F) por 2 hrs.

- No agite el medio de extracción ni el recipiente de extracción durante el procedimiento. La evaluación ideal de un material debe emplear tiempos y temperaturas que simulen el intento de uso. Exagerando las condiciones de extracción se intenta proporcionar un margen de seguridad para que haya lixiviación al aumentar la temperatura. La temperatura y la duración prescrita no deben tener efectos severos que afecten las características del material, esto es, no debe tener cambios drásticos.
- Al remover la fuente de calor, enfríe los recipientes pero no menos de 22 °C (71.6 °F). Cuando enfríe, agite vigorosamente los recipientes por 30 seg. y decante el líquido extraído en un recipiente estéril y seco.
- Selle herméticamente, de manera que los recipientes usados no tengan ventilación a una temperatura de 121 ± 2 ° C, no deben manejarse hasta que la temperatura interna y la presión hayan alcanzado las condiciones ambientales.
- Almacene los extractos líquidos a una temperatura de 22 a 30 °C (71.6 a 86 °F) y úselos en 24 hrs.
- Para minimizar el número requerido de animales de prueba para determinar la respuesta biológica, se permite una reserva de extractos líquidos de tres porciones de muestra.

a) Extracción para prueba química y física:

- Prepare una serie de cuatro porciones de 20 ml. para cada medio de extracción, el medio de extracción debe ser agua para inyección ó agua destilada
- La aplicación de un aceite vegetal, es opcional. Coloque una porción de muestra en cada uno de los tres recipientes; el medio de extracción en el cuarto recipiente sirve como blanco. Asegúrese de tapar cada uno de los recipientes.
- Use las mismas condiciones y procedimientos especificados para los extractos de prueba biológicas

REPORTE

El reporte debe incluir lo siguiente:

- Designación del estándar que se utilizo como gufa.
- Identificación completa del plástico u otro material sólido probado, incluyendo:
 - Tipo de aparato ó parte del material,
 - Dimensiones, peso del espécimen y porción de la muestra,
 - Código del fabricante, catálogo ó número de formulación, número de lote ó fecha de manufactura, nombre comercial e historia del material (forma de uso)
- Volumen del medio de extracción. También de el volumen entre la superficie de la porción de muestra (por ejemplo: 20 ml/120 cm² ó 60 cm²) ó el volumen del medio de extracción entre el peso de la porción de muestra.
- Condiciones de extracción; tiempo y temperatura.
- Medio de extracción.
- Resultado de los extractos líquidos de prueba para pruebas biológica, química y física.
- Alguna observación ó cambio físico drástico de las porciones de muestra ó extractos líquidos. Tales observaciones pueden incluir, pero no están restringidas, los cambios de color de la porción de muestra, cambios de color del extracto líquido, transmitancia de luz, y separación en fases etc.

PRUEBA ESTÁNDAR PARA LA PREPARACIÓN DE SUPERFICIE Y MARCADO DE IMPLANTES QUIRÚRGICOS METÁLICOS. (25)

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de superficie y el marcado de implantes pueden influenciar los siguientes aspectos importantes: la respuesta del tejido local, unión o carencia de unión al tejido que es un aspecto muy importante para la biocompatibilidad del material y la fuerte tensión del implante.

La respuesta del tejido local debido a los implantes metálicos es afectada por la corrosión, que a su vez es afectada por áreas y geometrías de superficie específicas, por la pasivación, por el electropulido, por las partículas extrañas incrustadas, la contaminación y otros factores. La contaminación y las partículas incrustadas en las superficies son el resultado de las operaciones de manufactura que pueden poner en peligro la compatibilidad, aún con la ausencia de corrosión. Por consiguiente son requeridas las especificaciones y los controles de las características de superficie que inhiben la respuesta local del tejido.

La fuerza de fatiga de los implantes es afectada por la topografía de las superficies, la tensión residual y la estructura. La fuerza de fatiga de una estructura puede ser determinada experimentalmente.

Esta práctica proporciona una descripción de las características de superficie, métodos de preparación de superficies y métodos de marcaje de implantes quirúrgicos.

La nomenclatura del marcaje no está especificada en esta práctica. Los requerimientos de las superficies y los métodos de marcaje incluidos en la especificación del implante deben preceder a los requerimientos enlistados en esta práctica.

Los implantes metálicos, cuando son inspeccionados de acuerdo a esta práctica, deben estar libres de imperfecciones en su superficie tales como: marcas de herramienta, muescas, rayas, grietas, cavidades, rebabas, y otros defectos que podrían impedir la utilidad del aparato. Las superficies deberán estar libres del material que se usó para el acabado y que podría estar incrustado o depositado, además de otros contaminantes indeseables.

Los requisitos específicos pertinentes al acabado de superficie, tales como la textura de la o tratamientos adicionales deberán estar incluidos en la especificación del implante.

La superficie de los implantes debe estar pasivada antes de implantarlos.

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

La superficie de una aleación o metal de prótesis o posible biomaterial, debe ser pulido usando papel metalográfico (lija) y alumina, hasta dejarlo a espejo, posteriormente se examina para localizar algún contaminante y observar su superficie libre de grietas, ralladuras etc., si existe se procede con el método de limpieza de superficie y después se rotula, de esta forma está listo para implantarse.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pulido

La superficie de la muestra se pule, usando series de papel metalográfico, de diferentes números hasta el 600, después se pasa al pulido automático, con alumina de 3µm hasta dejar la superficie con un terminado a espejo.

Inspección

Todas las superficies deben ser inspeccionadas visualmente o examinadas con lupa, tinta fluorescente penetrante u otros métodos apropiados que sean requeridos en la especificación del implante.

Limpieza

Los métodos de limpieza empleados deben incluir lo siguiente:

- Utilizar algún solvente orgánico desgrasante para remover aceites, grasas y otros contaminantes superficiales que se puedan remover.
- Para remover la superficies contaminadas con adherentes se puede hacer lo siguiente en caso necesario;
- Limpiar utilizando algún alcalino caliente.
- Limpiar con algún alcalino aplicado electrolíticamente.
- Limpiar con algún solvente orgánico agitando ultrasónicamente para remover las partículas incrustadas y limpiar, el limpiado para el titanio y tantalum pueden ser sometidos a una limpieza química. en caso de usar estas aleaciones consultar la referencia 6.
- Permita un tiempo de secado adecuado.

Nota 1- Evite el limpiado catódico de metales porque son susceptibles de contaminarse por hidrógeno así como el limpiado anódico que puede provocar hoyos.

Método de marcaje

- Los marcajes son aplicados a las superficies de los implantes para indicar la manufactura, tipo de implante, lote de producción e información adicional necesaria. Este marcaje es hecho por diferentes procesos, estos pueden afectar negativamente las propiedades deseables de los implante. Para prevenir un efecto negativo, es necesario que se use una apropiada técnica o procedimiento de marcaje y una localización apropiada de la marca del implante.
- Identifique o rotule los implantes metálicos de un modo que no deteriore las propiedades mecánicas o la resistencia a la corrosión y no provoque una respuesta adversa en el tejido.
- Sitúe el marcaje o el rótulo en el implante en un punto de baja tensión, de manera que no intercepte las orillas de los implantes. Indique la localización en el dibujo del implante junto con su especificación.
- Algunos métodos de marcaje son los siguientes:
- Impresión mecánica a través de una presión de rodillos o un asiento redondo o a través de tipos.

- Grabado químico usando un procedimiento de corriente electrolítica anódica.
- Marcar con un torno giratorio redondo con baja presión de contacto.
- Forma de identificación en la superficie usando un eje redondo y tipos.
- Marcar con un tipo vibratorio de contacto.
- Marcar con un electro lápiz.
- Marcar con rayo laser.
- Incluya la nomenclatura del marcaje en la especificación del implante.

Tratamiento final de la superficie

- Un apropiado tratamiento químico para asegurar una superficie pasivada en la última operación antes de montar, empacar y almacenar.
- El tratamiento final de superficie para acero inoxidable está especificado en las referencia (28, 32). Para las aleaciones de cobalto es especificado en las prácticas (30, 31) y para aleaciones en general es como sigue:
- Sumerja en ácido nítrico al 20 o al 40 % en volumen (con una gravedad específica de 1.1197 a 1.1527) en un cuarto de temperatura por 30 min. mínimo. Para acelerar el proceso, ésta solución de ácido, se puede calentar a una temperatura de 49 a 60° C. por 20 min. mínimo.
- Emplee todo el ácido neutralizado y enjuague con un proceso de agua y un proceso de secado total.
- El implante puede ser usado.
- Si tratamientos de superficie adicional son usados para implantes, estos tratamientos deben ser especificados y acompañados de la descripción del material.

PRUEBA ESTÁNDAR PARA CORROSIÓN (GRIETAS Y HOYOS) EN MATERIALES QUIRÚRGICOS METÁLICOS PARA IMPLANTES. (35)

INTRODUCCIÓN

La corrosión de algún implante o aparato metálico es indeseable por dos razones; primero porque la corrosión o degradación del metal puede hacer a éste estructuralmente débil o menos capaz para su función; segundo porque los productos resultantes de la corrosión pueden reaccionar desfavorablemente con el tejido adyacente al implante metálico o a veces en sitios distantes en el cuerpo. Por eso es necesario saber cuanto se corroe un implante metálico "in vitro", para tener en cuenta este problema antes de su uso clínico. Para saber si los productos de corrosión son tóxicos, estos pueden ser analizados en cultivo celular para estimar su toxicidad.

En la actualidad muchos materiales elegidos para implantes, no pueden ser diferenciados o examinados para corrosión por una simple prueba de inmersión convencional. Por ejemplo, si una aleación candidata es colocada en una solución relevante tal como la sangre, agua salada, saliva o un ácido débil por 10 años, menos del 0.1 % de los cambios de peso ocurrirá durante todo este periodo. Por consiguiente, para examinar materiales para implante en un periodo razonable, el proceso de corrosión será fomentado o acelerado de alguna manera. Para esto es usada la estimulación electroquímica para acelerar el proceso de corrosión.

El potencial electroquímico impuesto sobre la muestra metálica inmersa en una solución fisiológica, se incrementa constantemente hasta que la capa de óxido sobre la superficie del metal (la capa de pasivación) se rompe dando origen a una corrosión localizada. Este rompimiento es monitoreado como un incremento súbito en el flujo de corriente de la solución. Con este método, las aleaciones son clasificadas en términos del potencial al cual ocurre el primer rompimiento: el potencial más grande, el más resistente de la aleación es para romper la capa de repasivación y para la corrosión localizada.

Este método cubre la determinación de la resistencia para algunos de los efectos de corrosión (grietas y hoyos) de aleaciones metálicas para implantes quirúrgicos. Esta prueba se aplica a metales y aleaciones pasivadas. No se recomienda para aleaciones no pasivadas por que son susceptibles a la corrosión y normalmente no son idóneas para implantes.

Este método está diseñado para alcanzar condiciones lo suficientemente severas que causen el rompimiento de la aleación 316L de acero inoxidable usada actualmente como material de implante. Los materiales que sufren corrosión durante la prueba, no necesariamente sufren corrosión localizada cuando se implantan dentro del cuerpo humano.

Esta práctica puede usar como medio de corrosión suero fisiológico o solución de cloruro de sodio al 0.9 % para simular las condiciones en las que va a estar el material de prótesis dentro del cuerpo humano.

RESUMEN DE LA PRÁCTICA

Una muestra cilíndrica del material de prueba se ajusta a un collar de resina inerte, y se sumerge en un electrolito salino a 37°C por 1 hora para establecer un potencial de corrosión. La marca de hoyos o grietas de corrosión en la muestra se estimula por polarización potencioestática empleando un potencial más noble que el de corrosión. La estimulación de hoyos o grietas de corrosión se dará por el incremento en la corriente de polarización.

Inmediatamente después del paso de la corriente, se disminuye el potencial tan rápido como sea posible a uno de los diversos potenciales preseleccionados, o a uno más noble que el potencial de corrosión. La aleación puede marcarse de hoyos o grietas de corrosión en el potencial preseleccionado, y la corriente de polarización permanecerá en valores relativamente altos fluctuando o incrementándose en el tiempo.

Una examen de post-prueba de la muestra del metal, establecerá si la corrosión localizada a ocurrido dejando hoyos en la superficie expuesta o por ataque preferencial en grietas formadas por el collar de resina o ambos.

Si se detiene la corrosión en un potencial preseleccionado, la corriente de polarización descenderá a valores para pasivar la superficie y la corriente decrecerá continuamente. El parámetro de interés es el potencial crítico para dejar hoyos o grietas de corrosión, se define como el potencial preseleccionado más alto al cual la superficie re-pasivada se corroe (presenta hoyos o grietas) después del paso de corriente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para mayor información sobre el material que se utiliza en esta práctica consulte las referencias (11 y 35)

Preparación de muestras

- Fabrique del material de prueba un electrodo cilíndrico de trabajo con una longitud de 20.00 ± 1.00 mm (0.0787 ± 0.039 pul) y un diámetro de 6.35 ± 0.03 mm (0.250 ± 0.001 pul) ver fig. 1. Lije y pule la superficie con lija # 600 una hora antes del comienzo de la prueba, para mayor información del acabado consultar la prueba de terminado de superficie explicada en la sección de pruebas fisicoquímicas auxiliares o consultar la referencia 25.

- Ajuste un collar de resina inerte a la muestra, éste se hace a base de politetrafluoretileno (PTFE). El collar debe tener un diámetro exterior de 12.70 ± 0.05 mm (0.500 ± 0.002 pul) y un grueso de 3.18 ± 0.20 mm (0.125 ± 0.008 pul). Para que coincida con las dimensiones sugeridas, el diámetro interior del collar debe ser 5.97 ± 0.05 mm (0.235 ± 0.002 pul) a 6.73 ± 0.05 mm (0.265 ± 0.002 pul) para que se ajuste a la muestra y para que se haga la grieta. Ver figura 1 para el diseño del collar de resina.

- Sustenga la muestra dentro de la celda de polarización, puede usar una varilla de acero de la cual quede suspendida, tal y como se ilustra en la figura 1.

- Determine el área total de la superficie expuesta de la muestra antes de la colocación del collar de PTFE, A_T : Determine el área de la superficie interna del collar (área de grieta),

A_G : Determine la superficie del área expuesta de la muestra después de la colocación del collar A_E (donde $A_E = A_T + A_G$). Las dimensiones deberán medirse lo más cercano a 0.1 mm.

- Ejemplo- Usando previamente las dimensiones sugeridas para el diámetro de la muestra ($d = 6.35$ mm), longitud de la muestra ($l = 20.00$ mm) y el grueso del collar ($t = 3.18$ mm).

$$A_T = \pi dl + \pi d^2/4 = 431 \text{ mm}^2$$

$$A_G = \pi dt = 63 \text{ mm}^2$$

$$A_E = A_T + A_G = 386 \text{ mm}^2$$

- Use una plantilla mecánica para ajustar el collar de politetrafluoretileno (PTFE) sobre la muestra cilíndrica de prueba, de modo que ésta quede a 10 ± 2 mm (0.393 ± 0.079 pul) por arriba de la parte más baja de la muestra (ver figura 2).

Montaje del sistema en la celda de polarización

- Monte la muestra sobre el electrodo de trabajo e introdúscala por una de las bocas de la celda (ver Fig. 6).

- Degrade ultrasónicamente la armadura del electrodo, ya sea en acetona, tolueno ó benceno hirviendo (tener cuidado de no derramar), enjuague en agua destilada y seque.

- Transfiera 500 ml. de solución electrolítica (cloruro de sodio al 0.9 % o suero fisiológico) a la celda de polarización (aproximadamente de 1 litro) lleve la temperatura de la solución a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ por medio de un baño maría para simular las condiciones del cuerpo humano.

- Coloque en las otras bocas de la celda los electrodos auxiliares de platino, la sonda de puente de sal, el electrodo de referencia de Calomel, y cierre temporalmente el centro con un tapón (ver Fig. 6). Llene el puente de sal con el electrolito y mida el pH. Los niveles de la solución deben cubrir al mismo nivel a todos los electrodos y el puente de sal, para evitar estar sacándolos.

- Transfiera el electrodo montado de prueba (de Trabajo) a la celda de polarización y ajústelo en el extremo de la sonda del puente de sal, el cual es sumergido 2 mm (0.08 pul) por abajo del collar de PTFE.

Procedimiento

1.- Registre continuamente el potencial de corrosión del electrodo de trabajo (de la muestra) con respecto al electrodo de calomel durante una hora por medio de un potencioestado, después de ponerlo en marcha, inmediatamente se sumerge el electrodo de trabajo con la muestra. El potencial observado en la inmersión en el electrolito debe ser llamado el potencial inicial de corrosión E_0 . Al cabo de una hora el potencial debe ser conocido como el potencial final de corrosión, E_1 .

2.- Después de una hora, el potencial deberá ser cambiado potencioestáticamente a $+0.8$ V (SCE) para simular hoyos o grietas de corrosión, los cambios deben ser instantáneos

- 3.- Registre la corriente usando un graficador con una velocidad de graficación de 60 mm/minuto. Y con una escala de corriente máxima de 0 a 3 mA. La corriente será registrada a +0.8 V (SCE) por un periodo que depende de la reacción (ver figura 3).
- 4.- Si la corrosión localizada no es estimulada en los 20 seg. iniciales, la corriente de polarización permanecerá muy pequeña o decrecerá rápidamente con el tiempo. Proceda hasta el punto 8.
- 5.- La estimulación de la corrosión localizada será marcada ya sea por corrientes de polarización que generalmente incrementan con el tiempo o por densidades de corriente que exceden los 500 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (para la medida sugerida de la muestra sería equivalente a una corriente aproximadamente de 2 mA).
- 6.- Si la corriente incrementa generalmente con el tiempo, después de 20 seg. proceda hasta el punto 9.
- 7.- Si en algún momento una densidad de corriente de 500 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ es excedida, proceda inmediatamente hasta el punto 9. En algunos casos, en el cambio a +0.8 V (SCE), la densidad de corriente casi instantáneamente excederá de 500 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. En tales casos, proceda directamente hasta el 9 sin pausa.
- 8.- Si la corrosión localizada no es estimulada en los 20 seg. iniciales, continúe hasta +0.8 V (SCE) por 15 min. adicionales; la velocidad de graficación puede ser reducida a un mínimo de 5 mm/seg. después de los 20 seg. iniciales. Si la corrosión localizada es estimulada, proceda hasta el punto 9. Si la corrosión localizada no puede ser estimulada en 15 min., la prueba es terminada y se considera que el material tiene una alta resistencia a la corrosión localizada en el medio ambiente de la prueba. Reporte el potencial crítico como $> +0.8 \text{ V (SCE)}$.
- 9.- Si la corrosión localizada es estimulada a + 0.8 V (SCE), el potencial es retornado tan rápido como sea posible hasta E_1 (el cual es el primer potencial seleccionado) para determinar si la muestra repasivará o si la corrosión localizada continuará hasta propagarse en el potencial preseleccionado.
- 10.- Si la región repasivada se llena de hoyos o grietas en el potencial preseleccionado, la corriente polarizadora descenderá rápidamente a valores más bajos provocado una superficie pasivada (ver figura 4(a) por ejemplo). Monitoree esta corriente por 15 min.
- 11.- Durante estos 15 min., la velocidad de la graficadora puede ser reducida mínimo a 5 mm/min.
- 12.- Ajuste la escala de la corriente para obtener una exactitud satisfactoria.
- 13.- Si el hoyo o las regiones locales no son repasivadas en E_1 , entonces el voltaje crítico debe ser reportado como E_1 , anotando que la muestra nunca se repasivo después de la estimulación inicial. La prueba debe ser terminada.
- 14.- Después de asegurar la repasivación en E_1 al observar una corriente de polarización baja, decreciente (o constante) por 15 min., repita el paso de estimulación (de los puntos 2 y 3) a + 0.8 V (SCE) y entonces cambie el potencial tan rápido como sea posible hasta el segundo potencial preseleccionado el cual deberá estar lo más cercano a 0.05 V que es un incremento más noble que E_1 (en la escala SCE). Repetir el punto 10.
- 15.- Si E_1 es algún valor en el intervalo de - 0.100 hasta -0.051 V (SCE), entonces el segundo potencial preseleccionado debería ser - 0.050 V (SCE).
- 16.- La prueba consiste en alternar la estimulación entre + 0.8 V (SCE) y retornar a un potencial preseleccionado para observar si ocurre una repasivación. Después del segundo

potencial preseleccionado, incremente subsecuentemente los potenciales preseleccionados (esto es, para valores más nobles) en incrementos de 0.05 V.

17.- Ejemplos. Si E_i fue -0.90 V (SCE), el segundo potencial preseleccionado sería -0.50 V (SCE), el tercero sería 0.000 V (SCE), el cuarto + 0.050 V (SCE), seguido por + 0.100 V (SCE), + 0.150 V (SCE), etc.

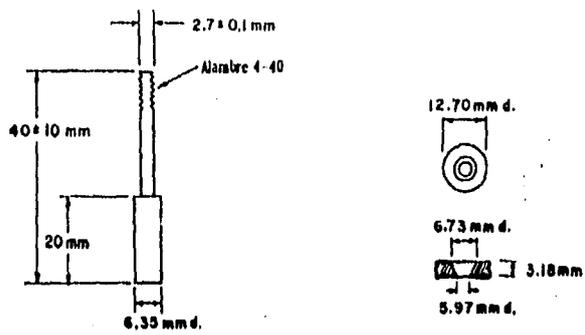
18.- En algún potencial preseleccionado, la corrosión localizada puede continuar propagándose hasta la repasivación, anunciada por continuos incrementos o largas fluctuaciones en la corriente durante los 15 minutos de observación (ver figura 4 (b) por ejemplo). En este punto, termine la prueba.

19.- En cualquier paso de los puntos 8 al 18 la prueba es terminada, remueva el collar y el asa y examine microscópicamente la muestra a 20 X para ver si tiene evidencias de hoyos, grietas de corrosión o decoloración.

REPORTE

El reporte debe incluir lo siguiente:

- La composición de la aleación, el nombre del producto, marca de fábrica o marcas similares que identifiquen la muestra.
- Cualquier tratamiento especial tal como tratamientos de calor cantidad de calor o frío con el que se trabajó, acabados de superficie diferentes del pulido metalográfico estándar de 600, tratamientos de pasivación (químicos, temperaturas, tiempos).
- El área total de la superficie expuesta de la muestra antes de colocarle el collar, AE; el área de la superficie debajo del collar, AC; y el área de la superficie expuesta de la muestra después de colocar el collar, AS.
- Potencial inicial de corrosión E_o .
- Potencial final de corrosión, E_i , al final de la primera hora.
- Potencial crítico para hacer hoyos o grietas de corrosión: esto es, el potencial preseleccionado más noble al cual el hoyo o grieta de la superficie continuaba repasivada después del paso de estimulación.
- Cuadro de densidad de corriente de polarización (que es, la corriente de polarización dividida por AS) contra el tiempo para el periodo de los 15 minutos en los potenciales preseleccionados e inmediatamente encima del potencial crítico (ver figura 4 y 5). Por convención, las densidades de corriente son reportadas en $\mu\text{A}/\text{cm}^2$.
- Las observaciones hechas durante el examen microscópico, incluyendo el tipo de corrosión localizada que ocurrió (los hoyos en el área expuesta, o grietas de corrosión en el área debajo del collar), medida aproximada y distribución espacial de algunos hoyos, y la apariencia y extensión aproximada de alguna grieta de corrosión o decoloración.
- Medir el pH antes y después de la prueba.



MUESTRA

COLLAR (P.T.F.E)

FIG. 1 Dimensiones de la Muestra y el Collar (35)

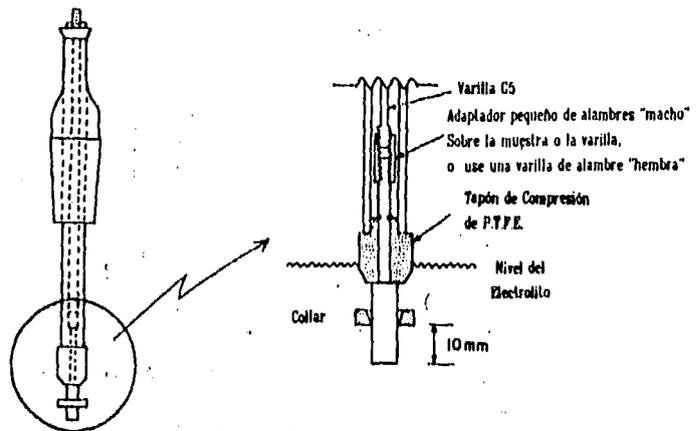
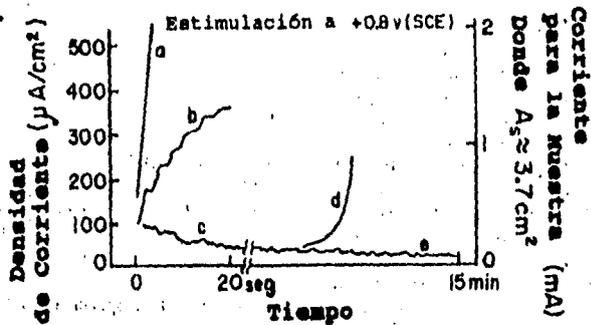


FIG. 2 Ensamblamiento del Asa del Electrodo (35)



Nota a- Si la densidad de corriente excede los $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Retorne al potencial preseleccionado

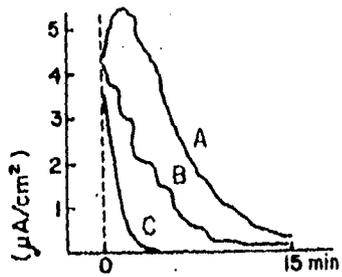
Nota b- Si a corriente se incrementa con el tiempo pero no excede nunca los $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Retorne al potencial preseleccionado después de 20 seg.

Nota c- Si la corrosión localizada no es estimulada en los 20 seg Iniciales. Continúe por 15 min más.

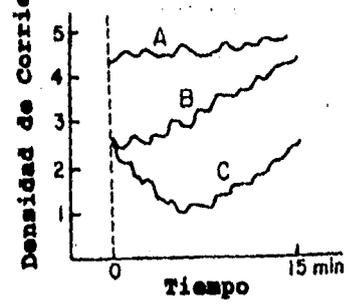
Nota d- Si la corrosión es eventualmente estimulada, retorne al potencial preseleccionado.

Nota e- Si la corrosión no puede ser nunca estimulada, después de 15 min, la prueba es terminada.

FIG. 3 Estimulación de la Corrosión Localizada (35)



(a) Ejemplos de Repasivación de A, B, y C.



(b) Ejemplos de Corrosión Localizada Continua de A, B, y C

FIG. 4 Ejemplos de Corriente Típica y Curvas de tiempo en un potencial preseleccionado (35)

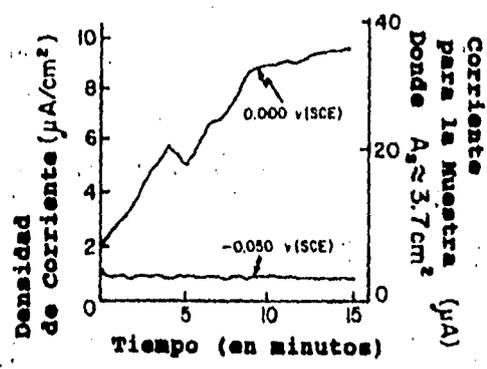


FIG. 5 Densidades Típicas de Corriente de Polarización (35)

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

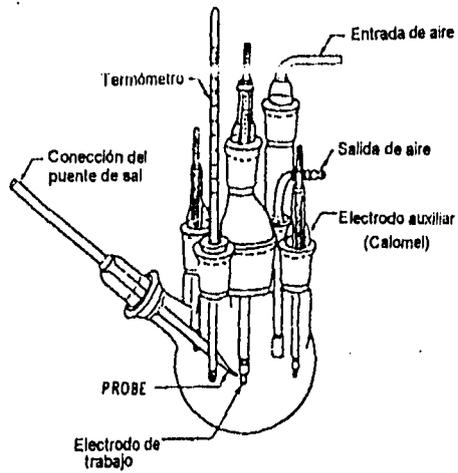


Fig. 6 Diagrama de una celdilla de polarización. (9)

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Con este trabajo doy a conocer las pruebas biológicas más comunes que se deben aplicar a los materiales propuestos para ser implantados, para comprobar su biocompatibilidad, complementadas con algunos métodos fisicoquímicos que son de gran utilidad para el desarrollo de éstas. Estas pruebas son estándares internacionales aprobadas, entendiéndose esto como aquellas que proporcionan un conocimiento científico sobre el material, repetitivo en el tiempo y en el espacio, caracterizando a éste desde cualquier punto de vista: físico, químico y biológico. Además han sido realizadas y con buenos resultados por varios laboratorios del mundo, dándoles el carácter de internacionales.

Con el incremento del uso de los biomateriales en sus diversas aplicaciones, ha crecido la necesidad de proporcionar un mayor entendimiento de la biocompatibilidad, los métodos para estimarla han sido analizados minuciosamente por organizaciones especialistas en pruebas estándar, su interés está enfocado al funcionamiento de los diversos materiales en el medio ambiente fisiológico, utilizando tanto pruebas "in vivo" como "in vitro", muchas de estas técnicas han sido desarrolladas durante la década de los ochenta.

Las pruebas de biocompatibilidad para probar materiales, han sido desarrolladas por asociaciones dedicadas a esto a partir de los años setenta, sin embargo el estudio de la biocompatibilidad es relativamente nuevo a partir de los estudios para conocer la interacción material-tejido en los ochenta, y las técnicas para desarrollarla, pueden ser mejoradas en el futuro. Estas pruebas pueden ser llevadas a cabo por diferentes laboratorios, aportando conocimientos nuevos y modificando las pruebas aquí mencionadas. Las pruebas de biocompatibilidad están abiertas a cualquier modificación, desde el modelo biológico que se utilice hasta las técnicas empleadas. Esto es de gran ayuda para los laboratorios o asociaciones que quieran llevar a cabo las pruebas, porque como sabemos, a veces la infraestructura y las condiciones económicas no permiten realizarlas tal y como se describen y se tienen que adaptar a las condiciones que prevalecen

Estas pruebas pueden ser aplicadas y mejoradas, sobre todo en aquellos países que no tengan una legislación para regular el uso de materiales que tengan contacto con el cuerpo humano, ya que las pruebas de la ASTM han servido como base para varios países que las han aplicado, como Inglaterra, Japón, Australia etc., debido a la gran experiencia de muchos años con la que cuenta esta asociación en este campo.

Al revisar la literatura, encontré que las pruebas de biocompatibilidad se usan a veces sin un orden específico y existe cierta confusión de cual debemos aplicar a los materiales potencialmente biocompatibles. El orden propuesto en este trabajo para las pruebas de biocompatibilidad ayudará a facilitar el trabajo de aplicación de las pruebas a estos materiales y, así podremos decir que antes de someterlos a las pruebas "in vivo", todos los materiales deben ser probados "in vitro", ya que estas son de gran ayuda en la correlación con las pruebas "in vivo" y son más sensibles a cantidades pequeñas de tóxicos, esto nos evitaría sacrificar animales. Si los materiales resultan no ser tóxicos en las pruebas "in vitro", se pueden llevar a cabo las "in vivo", de las cuales empezáramos aplicando las de irritación y contactos alérgicos, las cuales nos detectan si un material es un estimulador del sistema inmunológico y de esta forma nos evitaríamos también sacrificar animales al implantar el material a un animal, ya que si un material resulta alérgico, puede ser

rechazado al ser implantado. Posteriormente se aplicaría la prueba de inyección sistémica, la cual nos detecta si son o no tóxicos los productos de lixiviación del material de implante y si una material resulta no tóxico, entonces por último se aplicarían las pruebas de implante en tejido suave y hueso, las cuales nos dicen qué tanto es compatible un material dentro del organismo.

Como vemos el material que sea sometido a las pruebas de biocompatibilidad, debe primero pasar las pruebas "in vitro" antes de usar las "in vivo", pero también dentro de éstas, el material primero tiene que ser evaluado para conocer si es o no un estimulador inmunológico, por que si no pasa las pruebas de irritación y contactos alérgicos, no puede ser usado ya para las pruebas de implante por las razones mencionadas arriba. Algunos materiales se conoce que sufren lixiviación en medios fisiológicos, y los productos de este fenómeno químico, pueden ser tóxicos, por lo cual se prueban por inyección sistémica, y si los materiales tienen productos de lixiviación tóxicos no pueden ser usados para implantes. En conclusión se sugiere que los biomateriales o materiales potencialmente biocompatibles, se sometan al mayor número de pruebas para obtener su caracterización más completa desde el punto de vista biológico, siguiendo el orden propuesto en este trabajo.

De las pruebas "in vitro" podemos decir lo siguiente:

- a) La prueba de cultivo celular en contacto con materiales para aparatos médicos sirve para evaluar la toxicidad de materiales no pesados como los polímeros usados en forma de películas, o si se usan metales, aleaciones metálicas o cerámicas, tienen que ser en forma de polvos, el problema es que no cause un daño a las células el peso del material, las células usadas son fibroblasto de tejido conjuntivo de ratón cepa L 929.
- b) La prueba de difusión en agar, sirve para probar materiales que se disuelven (como algunos polímeros o aleaciones) o corroen en medios fisiológicos (como las aleaciones metálicas), además estos productos deben difundir a través del agar para que tengan contacto con las células de la cepa L 929 de tejido conjuntivo de ratón.
- c) La prueba de compatibilidad celular para materiales para prótesis orofacial, como su nombre lo dice es específica de los materiales que se usan principalmente en los tratamientos odontológicos (como son cerámicas, polímeros y aleaciones metálicas), por eso se usan las células de mucosa bucal como modelo experimental.
- d) La prueba de hemólisis, evalúa "in vitro" si un material que se va usar como prótesis y que va a tener contacto con la sangre (como lo son la válvulas cardiacas, riñones artificiales, etc.) pueda provocar lisis de eritocitos.

Con respecto de la pruebas "in vivo" podemos mencionar que:

- a) Las pruebas de contactos alérgicos tanto la que utiliza conejos como puercos de guinea, son útiles para materiales que se corroen o sufren lixiviación (como aleaciones metálicas y polímeros), ambas evalúan qué tan irritante o alergénico es un material al contacto con la piel, esto es de gran ayuda para conocer si un material puede activar o no el sistema inmune.
- b) La prueba de inyección intracutánea también evalúa materiales que se corroen o lixivian (como son aleaciones metálicas y polímeros), y da información acerca de que tan irritante o alergénico en un material a nivel intracutáneo.

c) La prueba de inyección sistémica, evalúa los mismos materiales que la anterior prueba, pero en este caso se inyectan los productos de lixiviación o corrosión intraperitoneal o intramuscularmente a ratones o ratas, y se observan los animales para algún síntoma de toxicidad o muerte.

d) Las pruebas de implante evalúan la compatibilidad de materiales a nivel muscular y óseo, los materiales que se evalúan en estas pruebas son aleaciones metálicas, polímeros y cerámicas, primero se lleva a cabo la prueba en músculo de rata, conejo y perro por un periodo corto y después la de periodo largo se realiza de nuevo en músculo de rata, conejo y perro y en hueso de conejo y perro.

Las pruebas fisicoquímicas auxiliares nos ayudan a obtener lo siguiente:

a) La prueba de corrosión en medios fisiológicos, evalúa que tanto se corroe una aleación metálica en suero a 37 ° C, estos datos nos sirven para tener en cuenta la corrosión del material al implantarlo, ya que los productos de corrosión pueden ser tóxicos dentro del sitio de implante en el cuerpo de algún animal de experimentación o dentro del cuerpo humano.

b) La prueba de superficie, nos ayuda a obtener una superficie adecuada en materiales metálicos que se utilizan como implantes, porque la estructura o textura de una superficie de éstos, puede causar estrés mecánico en el tejido donde será implantado provocando un rechazo de los materiales.

c) La prueba de extracción nos proporciona un método por el cual podemos obtener productos de lixiviación de materiales metálicos, cerámicos y poliméricos en medios que simulan fluidos corporales, para usarlos en las pruebas de cultivos de tejido, irritación o inyección sistémica o subcutánea.

En general el avance en el estudio de la biocompatibilidad para los materiales implantados requiere de resultados rápidos, por eso su evaluación es un poco cualitativa, ya que se enfoca principalmente a la observación de parámetros como: morfología, lisis celular "in vitro", y necrosis, edema, eritema en los tejidos in vivo que tienen contacto con el material de prueba, así como el grosor de la capa fibrosa y sólo a veces se toman datos cualitativos como; el número de células del sistema inmunológico. En el futuro pienso que, para obtener resultados cuantitativos se deben utilizar técnicas que nos den este tipo de resultados, tales como: las técnicas fisicoquímicas (que detectan la degradación del material en un medio fisiológico), bioquímicas (las cuales nos podrían decir la forma en que interaccionan las proteínas con los materiales) y genéticas (las cuales detectan daño o interacciones de los materiales con el DNA), investigando la interfase material tejido y observar las reacciones que el material le causa al tejido o viceversa mediante la ayuda de la microscopía electrónica, así como ampliar más el campo de los biomateriales. En conclusión el campo de la biocompatibilidad está abierto a la investigación, y todo avance será de gran ayuda en la comprensión de ésta.

Se puede decir que un material no es 100 % biocompatible, ya que siempre cualquier material que se introduce en el organismo por naturaleza es reconocido como un cuerpo extraño, estimulando tanto al sistema inmunológico como al tejido adyacente al implante, este tejido reacciona generalmente envolviendo con una capa fibrosa al implante como un sistema de defensa. Los materiales que ya han sido estudiados y aceptados como

biomateriales para uso en humanos provocan una reacción muy leve, y el grueso de la capa fibrosa es delgada, estos materiales se usan como referencia para probar nuevos materiales.

El ambiente interno rico en agua, sales, proteínas, minerales, etc. interactúa con los biomateriales, provocando en éstos corrosión, lixiviación, solubilidad, etc., todos estos productos pueden hacer que el material sea rechazado, ya que pueden ser tóxicos, tomando también en cuenta los productos que se desprenden de estos materiales, debido a la al movimiento mecánica del organismo que produce desgaste y fricción en éstos. Por eso es necesario conocer estas propiedades de los materiales "in vitro", antes de usarlos como implantes, por eso en este trabajo se mencionan dos pruebas fisicoquímicas la prueba de corrosión y la prueba de extracción (lixiviación) en líquidos fisiológicos "in vitro", de las cuales, inclusive se pueden usar sus productos en las pruebas de cultivos celulares e "in vivo" en las pruebas de inyección sistémica, irritación de piel, etc., para probar si son o no tóxicos.

Las pruebas presentadas en este trabajo, se pueden aplicar a materiales potencialmente biocompatibles, además pueden ser de gran ayuda para los análisis clínicos en hospitales para determinar si una persona es o no alérgica a ciertas aleaciones, polímeros etc., antes de que se le implanten como ayuda para su enfermedad o lesión y no le resulten a largo plazo dañinas.

GLOSARIO

Alicuota: pequeña cantidad de algún líquido (solución, mezcla, etc) (38)

Alteración celular: es un cambio en la característica de una línea celular, generalmente asociado con alteración de la morfología, inhibición de contacto, cariotipo, susceptibilidad viral y habilidad para crecer en suspensión. (61)

Biomaterial: puede ser algún material que tenga contacto con tejidos de pacientes por un período de tiempo para ayudar en algún tratamiento. (2)

Biocompatibilidad: se refiere a la interacción que tiene un biomaterial en un ambiente fisiológico, en el que está en contacto con tejidos y fluidos corporales, sin afectar adversamente este medio ambiente. (2)

Blanco: El medio de extracción no conteniendo ninguna muestra de prueba, es usado como comparación con el extracto líquido.(27)

Cepa celular: un tipo de células derivadas de algún cultivo primario o de una línea celular teniendo características específicas notablemente marcadas bioquímicas y/o biofísicas que persistan durante subsecuentes cultivos. En la descripción de una cepa celular, sus formas específicas deben ser definidas como por ejemplo; una cepa celular con cierto cromosoma marcado, o una cepa celular la cual ha adquirido resistencia a ciertos virus, o una cepa celular teniendo un antígeno específico y así sucesivamente.(43, 61)

Citotoxicidad: un efecto o resultado de efectos producidos en un tejido o células por la presencia de materiales de prueba. Es el grado de deterioro del crecimiento hasta completar la lisis celular o disolución cuando los cultivos de prueba son comparados con un blanco de referencia esto, observado microscópicamente y/o visualmente. (2)

Célula: es la unidad fundamental de todo ser vivo. (61)

Crecimiento celular: incremento en la masa de sustancia viva y/o número de células.(43)

Condición dinámica: es la condición en la cual la muestra sometida a la prueba de hemólisis es dejada en movimiento durante todo el periodo de incubación. (38)

Condición estática: es aquella en la cual la muestra sometida a la prueba de hemólisis es dejada estacionaria durante el periodo de incubación. (38)

Control negativo: es un material o sustancia que produce una leve o no toxicidad, tal como el polietileno del estándar de referencia de control negativo de plástico de la USP. Es deseable que las muestras de control negativo tengan la misma configuración que la muestra de prueba. (36,57)

Control positivo: es un material (plástico, metálico) o cualquier otra sustancia capaz de producir generalmente un índice tóxico elevado. (36)

Corrosión: Es la reacción química o electroquímica entre un material, generalmente metálico y su medio ambiente, lo cual produce un deterioro del material y sus propiedades. (10, 34)

Corrosión localizada: Es la corrosión en sitios discretos sobre la superficie de un metal, pueden ser grietas u hoyos. (10, 34)

Cultivo celular: es el crecimiento de células "in vitro". (61)

Cultivo primario: cultivo inicial de células extraídas por medio de una biopsia de tejidos u órganos tomados directamente de un organismo; un cultivo primario puede ser considerado como tal hasta que sea subcultivado por primera vez, entonces llega a ser una línea celular. (43, 58)

Cultivo de tejidos: el mantenimiento y proliferación de fragmentos de tejido "in vitro"; las condiciones del cultivo pueden o no ser determinadas para preservar el tejido primordial morfológicamente. (43, 58)

Densidad de corriente: Es la corriente eléctrica producida por la superficie de un electrodo por unidad de área. (10, 11, 34)

Diálisis: proceso de separación de cristaloides y coloides en solución por la diferencia en sus velocidades de difusión a través de una membrana semipermeable. (43)

Efectos citotóxicos: efectos en el cultivo que pueden incluir decremento en la eficiencia de la placa, lisis celular, inhibición de síntesis molecular y crecimiento celular y desprendimiento de células del sustrato. (40, 41, 43)

Elución: Separación mediante un fluido, de una sustancia retenida en una fase estacionaria, se aplica generalmente en cromatografía. (43)

Explante: fragmento de tejido u órgano extraído de un donador usado para el cultivo inicial. (58)

Extracto: es una sustancia lixiviada del material de prueba más un líquido fisiológico. (27)

Extracto líquido: Es el líquido fisiológico probado para respuesta biológica, química o física; es el resultado final de la lixiviación de materiales. (27)

Metafase: estado de la mitosis en la cual los cromosomas están firmemente unidos al huso mitótico en su ecuador y aún no han migrado a los polos. (61)

Grieta de corrosión: corrosión localizada de la superficie de un metal que está expuesto al medio ambiente. (10, 34)

Hemoglobina de plasma: la cantidad de hemoglobina (contenido de proteína hemo-hierro) en el plasma. (38)

Hemólisis: es la destrucción de eritrocitos que provoca la liberación de la hemoglobina en el fluido sobrenadante. (38)

Hemólisis comparativa: es la cantidad de hemólisis en miligramos de hemoglobina por mililitro (mg/ml) producida por un material, comparado con la producida por un material estándar de referencia (como el control negativo de plástico de la USP). (38)

Hoyos de corrosión: Corrosión de la superficie de un metal, en un punto o área pequeña, que puede tomar la forma de una cavidad. (10, 34)

Índice hemolítico: es el cociente en porcentaje de la hemoglobina de plasma liberada por las muestras o extractos divididos por la hemoglobina total presente en el sustrato de sangre. (38)

Línea celular: Una línea celular surge de un cultivo primario, al ser subcultivado varias veces en el tiempo e implica que con los cultivos de éstas se produzcan numerosos linajes de células con nuevas características en cuanto a forma y constitución de cromosomas. (58)

Línea celular estabilizada: una línea celular que tiene el potencial para ser subcultivada indefinidamente "in vitro". (58)

Liofilización: Criodeshidratación, secado; método de separación del agua de una sustancia o de una disolución por congelación, también se puede por sublimación a presión reduciendo el hielo formado a un material esponjoso que se disuelve posteriormente con facilidad. Se utiliza en la deshidratación de alimentos, materiales biológicos y otros productos sensibles al calor. (48)

Lisis: rompimiento o desintegración de células. (43)

Lixiviación: Extracción sólido-líquido; separación de componentes de una mezcla sólida por contacto con un disolvente adecuado, se utiliza para la recuperación de determinado componente de los sólidos que los contienen, este método tiene especial importancia en diferentes áreas como: la minería, toxicología, química, etc. (20, 27)

Medio: mezcla de sustancias esenciales para el crecimiento celular en cultivo, principalmente compuesta de aminoácidos. (58)

Medio de extracción: Un líquido especificado que simula fluidos corporales (como por ejemplo aceites vegetales, sueros fisiológicos, medios de cultivo celular etc). usado en la prueba de extracción para provocar el fenómeno de la lixiviación. (27)

Medio químicamente definido: un medio compuesto totalmente de componentes químicos conocidos en los cuales las células puedan ser cultivadas sin algún aditivo determinado. (43)

Monocapa: capa sencilla de crecimiento celular en una superficie. (43)

Pasivación: Disminución de la reactividad química de una superficie metálica para evitar su corrosión. Se lleva a cabo por ionización o por inersión del metal en una disolución adecuada. (10, 34)

Porción de muestra: La unidad o unidades de plástico u otros materiales colocados en el medio de extracción. (27)

Corriente de polarización: Es el cambio de potencial de un electrodo con circuito abierto como resultado del paso de una corriente. (10, 11, 34)

Potencial de corrosión: Es el potencial de una superficie corroída en un electrolito, medido con respecto a un electrodo de referencia, en condiciones de un circuito abierto. (10, 34)

Potencioestato: Es un instrumento para mantener automáticamente un electrodo en un electrolito a un potencial constante o potenciales controlados con respecto a un electrodo de referencia. (10, 11, 34)

Prueba de contacto: es una prueba de hemólisis llevada a cabo con el material de prueba en contacto con eritrocitos del plasma. (38)

Prueba de extracto: es una prueba de hemólisis llevada a cabo con un extracto isotónico del material de prueba en contacto con el eritrocito del plasma. (38)

Senescencia celular: un marcado cambio en algún crecimiento significativo y/o morfológico indicativo de una pronunciada falta de viabilidad celular. (43)

Subcultivo: La transferencia de células de un vaso de cultivo a otro. (43, 55, 58)

Substancia citotóxica: sustancia que inhibe o impide las funciones de las células, o causa destrucción de las células o ambas. (43)

Suero: porción del fluido de la sangre obtenido por diálisis y coagulación. (43)

Traslado: este término es sinónimo de subcultivo, y puede denotar el paso de células de un vaso de cultivo a otro. (43)

BIBLIOGRAFÍA.

- (1) W.J Boretos. Contemporary Biomaterials. Ed Noyes Eden M Publications, New Jersey, U.S.A. 1984. pp 46-65, 180-192, 626-651.
- (2) D.F, Williams. Fundamental Aspects of Biocompatibility. Vol I. Ed CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A. 1981. p 223.
- (3) D.F, Williams. Fundamental Aspects of Biocompatibility. Vol II. Ed CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A. 1981. p 307.
- (4) D.F, Williams. Techniques of Biocompatibility Testing. Vol I. Ed CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A. 1986. p 202.
- (5) D.F, Williams. Techniques of Biocompatibility Testing. Vol II. Ed CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A. 1986. p 225.
- (6) ASTM B 600, Practice for Descaling and Cleaning Titanium and Titanium Alloy Surfaces, American Society for Testing and Materials, Nonferrous Metals. ASTM, Philadelphia USA, Vol 02.04, 1993.
- (7) ASTM E 4, Practices for Load Verification of Testing Machines, American Society for Testing and Material, Metals- Mechanical Testing. ASTM, Philadelphia, USA, Vol 03.01, 1991.
- (8) ASTM E 112 , Test Methods for Determining Average Grain Size, American Society for Testing and Material, Metals- Mechanical Testing. ASTM, Philadelphia, USA, Vol 03.01, 1991.
- (9) ASTM G3, Practice for Convention Applicable to Electrochemical Measurements in Corrosion Testing, American Society for Testing and Material, Wear and Erosion; Metal Corrosion, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 03.02, 1993.
- (10) ASTM G 15, Terminology Relating to Corrosion and Corrosion Testing, American Society for Testing and Material, Wear and Erosion; Metal Corrosion, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 03.02, 1993.
- (11) ASTM G5, Standard Reference Test Method For Marking Potentiostatic and potentiodynamic Anodic Polarization Measurements, American Society for Testing and Material, Wear and Erosion; Metal Corrosion, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 03.02, 1993.
- (12) ASTM C 573, Methods for Chemicals Analysis of Fireclay and High-Alumina Refractories, American Society for Testing and Material, Analytical Chemistry for Metals (II). ASTM, Philadelphia, USA, Vol 03.06, 1991.
- (13) ASTM D 543, Test Method for Resistance of Plastics to Chemical Reagents, American Society for Testing and Material, Plastics (I), ASTM, Philadelphia, USA, Vol 08.01, 1991.
- (14) ASTM D 570, Test Method for Water Absorption of Plastics, American Society for Testing and Material, Plastics (I), ASTM, Philadelphia, USA, Vol 08.01, 1991.
- (15) ASTM D 618, Methods of Conditioning Plastics and Electrical Insulating for Testing, American Society for Testing and Material, Plastics (I), ASTM, Philadelphia, USA, Vol 08.01, 1991.
- (16) ASTM D 883, Definitions of Terms Relating to Plastic, American Society for Testing and Material, Plastics (I), ASTM, Philadelphia, USA, Vol 08.01, 1991.

- (17) ASTM D 1239, Test Method for Resistance of Plastic Films to Extraction by Chemicals, American Society for Testing and Material, Plastics (I), ASTM, Philadelphia, USA, Vol 08.01, 1991.
- (18) ASTM D 1898, Practice for Sampling of Plastics, American Society for Testing and Material, Plastics (II), ASTM, Philadelphia, USA, Vol 08.02, 1991.
- (19) ASTM D 1068, Test Methods for Iron in Water, American Society for Testing and Material, Water (I), ASTM, Philadelphia, USA, Vol 11.01, 1991.
- (20) ASTM D 1193, Specification for Reagent Water, American Society for Testing and Material, Water (I), ASTM, Philadelphia, USA, Vol 11.01, 1991.
- (21) ASTM D 2461, Test Method for Iron-59 in Water, American Society for Testing and Material, Water (I), ASTM, Philadelphia, USA, Vol 11.01, 1991.
- (22) ASTM E 1262, Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, American Society for Testing and Material, Hazardous Substances and Oil Responses, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 11.04, 1991.
- (23) ASTM E 1280, Guide for Performing the Mouse Lymphoma Assay for Mammalian Cell Mutagenicity, American Society for Testing and Material, Hazardous Substances and Oil Responses, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 11.04, 1991.
- (24) ASTM F 67, Specification for Unalloyed Titanium for Surgical Implant Applications, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (25) ASTM F 86, Practice for Surface Preparation and Marking of Metallic Surgical Implants, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (26) ASTM F 603, Specification for High Purity Dense Aluminum Oxide for Surgical Implant Application, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (27) ASTM F 619, Practice for Extraction of Medical Plastics, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (28) ASTM F 642, Specification for Stainless Steel Flexible Wire for Surgical Fixations for Soft Tissue, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (29) ASTM F 643, Specification for Wrought Cobalt Chromium Alloy Flexible Wire for Surgical Fixations for Soft Tissue, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (30) ASTM F 644, Specification for Wrought Cobalt-Chromium Alloy Flexible Wire for Surgical Fixations for Bone, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (31) ASTM F 666, Specifications for Stainless Steel Flexible Wire for Surgical Fixation for Bone, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.

- (32) ASTM F 719, Practice for Testing Biomaterials in Rabbits for Primary Sking Irritation, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (33) ASTM F 720, Practice for Testing Guinea Pigs for Contact Allergens: Guinea Pig Maximization Test, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA Vol 13.01, 1991.
- (34) ASTM F746, Standar Test Method for Pitting or Crevice Corrosion of Metallic Surgical Implant Materials, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (35) ASTM F 748, Practice For Selecting Generic Biological Test Methods for Materials and Devices, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (36) ASTM F 749, Practice for Evaluating Material Extracts by Intracutaneous Injection in the Rabbit, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (37) ASTM F 750, Practice for Evaluating Material Extracts by Systemic Injection in the Mouse, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (38) ASTM F 756, Practice for Assessment of the Hemolytic Properties of Materials, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (39) ASTM F 763, Practice for Short-Term Screening of Implant Materials, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (40) ASTM F 813, Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA Vol 13.01, 1991.
- (41) ASTM F 895, Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (42) ASTM F 981, Standar Practice for Assessment of Compatibility of Biomaterials (Nonporous) for Surgical Implants With Respect to Effect of Materials on Muscle and Bone, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (43) ASTM F 1027, Practice for Tissue and Cell Compatibility of Orofacial Prosthetic Materials and Devices, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 13.01, 1991.
- (44) E122, Practice for Choice of Sample Size to Estimate the Average Quality of a Lot or Process, American Society for Testing and Materials, General Test Methods, ASTM Philadelphia, USA, Vol 14.02, 1991.
- (45) ASTM E 691, Practice for Conducting an Interlaboratory Study to Determine the Precision of a Test Method, American Society for Testing and Materials, General Test Methods, ASTM Philadelphia, USA, Vol 14.02, 1991.
- (46) ASTM C 20, Test Methods for Apparent Porosity, Water Absorption, Aparent Specific Gravity, and Bulk Density of Burned Refractory Brick and Shapes by Boiling Water, American Society for Testing and Materials, Refractories; Carbon and Graphite Products, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 15.01, 1991.
- (47) ASTM C 674, Test Methods for Flexural Proprieties of Ceramic Whiteware Materials, American Society for Testing and Materials, Glass; Ceramics Whitwares, ASTM Philadelphia, USA, Vol 15.02, 1991.

- (48) ASTM E 171, Especification for Standar Atmospheres for Conditioning and Testing Materials, American Society for Testing and Materials, Space Simulation, Aerospace and Aircraft, ASTM, Philadelphia, USA, Vol 15.03, 1991.
- (49) D.F, Williams. Biocompatibility of Orthopedic Implants. Vol I. Ed CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A. 1982. p 313.
- (50) Hemoglobin Product. Class Standard , U.S. FDA, 1977 Hemoglobin Product Class Standard.
- (51) K.J, Bundy, et al. Stress-Enhanced ion release- the Effect of Static Loading. Biomaterials, Vol 12, September 1991, pp 627-639.
- (52) K, Jeromic. Fundamental Aspects of Corrosion of Metallic Implants Corrosion and degradation of Implant Materials, ASTM STP 684, Eds: B.C Syrett and A. Acharya . American Society for Testing of Materials, 1979, pp 107-127
- (53) N.C, Blumenthal and V. Cosma, in Mat. Res. Soc. Symp. Proc.252 (1991), pp 29-35. Effects of Metal Ions on Apatite Formation and Bone Mineralization. Eds: Linda G. Cima and Eyal S. Ron. Boston, Ma, U.S.A. December 4-5.
- (54) P. Ducheyne and G.W, Hastings. Metal And Ceramic Biomaterials. Vol I. Ed CRC Press, Inc. Boca Raton , Florida, U.S.A. 1984. p125.
- (55) R.I.Freshney. Culture of Animal Cells a Manual of Basic Techniques, Ed Alan R. Liss, Inc. New York,U.S.A. 1984. p 270.
- (56) The American Type Culture Collection, ATCC, Catalog of Strains II,12031 Parklawn Drive, Rockville, MD, 10852.American Type Culture Collection, (ATCC).
- (57) USP Negative Control Plastic Reference Standard, U.S, Pharmacopeia, Biological Test Plastics, Vol XX, Marck PUBLISHING, Easton, Pa, 1980, pp 868.
- (58) Sharp, J.A. Introducción al cultivo de los tejidos animales. Ed. Omega, Barcelona ,España, 1989. p 57.
- (59) Kawahara,H. Biological Requirement for Biomaterials, Proceeding of the International Simposium on Biomaterial, Taipei, Taiwan, 1985, p 15-37.
- (60) Ciapetti, G. et al. Toxicity of cyanarylates in vitro using extract dilution assay on cell cultures. Biomaterials, vol 15, No 2, 1994, p 92-96.
- (61) Brucee, A. et al. Molecular Biology of the Cell. Third Edition, Ed.. Garland Publishing, Inc., U.S.A., 1994, p. 1299, 1303.