

## ACTIVIDAD 6

### ENTREGABLE 1

#### RESUMEN DE LOS PROCEDIMIENTOS PUBLICADOS

#### 1. OBJETIVO

El objetivo del entregable es presentar los resultados correspondientes al PT1 de revisión de los actuales procedimientos de aislamiento de partículas metálicas. Dichos resultados se derivan de las tareas realizadas, las cuales se ha dividido en 3 tareas principales descritas en el documento de memoria del proyecto:

1. Revisión bibliográfica en bases de datos de literatura científica.
2. Revisión de la normativa actualmente vigente a nivel internacional.
3. Obtención de los procedimientos patrón encontrados en bibliografía. Selección de los procedimientos más adecuados.

#### 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE EL AISLAMIENTO DE PARTÍCULAS METÁLICAS

A lo largo de toda la primera anualidad se ha llevado a cabo el seguimiento de las publicaciones relacionadas con técnicas de aislamiento de partículas metálicas procedentes de simuladores de desgaste protésico.

A continuación se resumen las búsquedas realizadas y los parámetros utilizados en cada una de ellas:

PARÁMETROS DE BÚSQUEDA 1	
<b>Periodo de búsqueda</b>	1 de enero de 2000 – 31 de diciembre de 2015
<b>Términos de búsqueda</b>	<i>Simulator wear metal particles</i>
<b>Artículos encontrados</b>	213 artículos encontrados
<b>Artículos relevantes</b>	6 artículos relevantes: [1] [2] [3] [4] [5] [6]
<b>Criterios de inclusión</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Artículos relativos a prótesis Metal-Metal</li><li>• Estudios en simulador de desgaste</li></ul>
<b>Criterios de exclusión</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cualquier combinación de par de desgaste diferente al Metal-Metal</li><li>• Estudios in vivo</li><li>• Estudios con muestras cadavéricas</li><li>• Estudios de aislamiento a partir de tejido</li></ul>

PARÁMETROS DE BÚSQUEDA 2	
<b>Periodo de búsqueda</b>	1 de enero de 2000 – 31 de diciembre de 2015
<b>Términos de búsqueda</b>	<i>Isolation metal wear particles</i>
<b>Artículos encontrados</b>	268 artículos encontrados
<b>Artículos relevantes</b>	De los 268, 42 ya habían sido revisados con anterioridad en la búsqueda anterior. De entre los 226 restantes no se encontró ningún

artículo relevante más allá de los 6 artículos ya encontrados.	
<b>Criterios de inclusión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artículos relativos a prótesis Metal-Metal</li> <li>• Estudios en simulador de desgaste</li> </ul>
<b>Criterios de exclusión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cualquier combinación de par de desgaste diferente al Metal-Metal</li> <li>• Estudios in vivo</li> <li>• Estudios con muestras cadavéricas</li> <li>• Estudios de aislamiento a partir de tejido</li> </ul>

Dos de los artículos relevantes son artículos de revisión ([1] y [2]), en los cuales se abordan diversos métodos de aislamiento de partículas. Los otros cuatro artículos hacen referencia directa a tres métodos de aislamiento diferentes. El artículo de Pourzal *et al.*[3] hace referencia a uno de los métodos enzimáticos más ampliamente extendidos en la bibliografía, que es el método descrito por Catelas y colaboradores en dos artículos que se han convertido en referencia en el campo del análisis de partículas metálicas[7][8].

Por otro lado, el artículo de Leslie *et al.* de 2009 [4] hace referencia a otro método enzimático publicado en 2007 y que también es considerado un artículo referente, el artículo de Brown y colaboradores[9].

El tercer artículo de interés es el más reciente de todos, publicado por Billi *et al.* en 2012 [5] y ganador del premio Charnley, en el que se presenta un nuevo protocolo de digestión de suero de desgaste y aislamiento de partículas también basado en el uso de enzimas.

Para finalizar, mencionar el artículo de Hallab y colaboradores de 2008 [6] en el cual se presenta un método propio basado también en digestiones enzimáticas de los sueros de desgaste.

En el artículo de Billi y colaboradores de 2012, se hace una revisión de los métodos más conocidos y utilizados para la digestión de sueros lubricantes en ensayos de desgaste en simulador para su posterior análisis de partículas. En la Figura 1 se muestra la tabla resumen publicada por los autores antes mencionados.

Study	Year	Digestion	Purification	Display	Image	Total number of particles examined	Measured parameters	Statistics
Schmiedberg et al. [38]	1994	Papain, proteinase K (NaOH wash)	Multiple sequential WCS (7 steps)	Drop evaporation	SEM	20	Length, width	Mean, SD
Doorn et al. [16]*	1998	Papain, proteinase K	Multiple sequential WCS (4 steps)	Nebulization on TEM grid	TEM	1–580	Diameter	Box plots
Tipper et al. [41]	1999	KOH 60°C	Extraction with chloroform:methanol (2:1) and repeated washes with 50% (v/v) acetone	Filtration	SEM	100	Mean $d_{max}$ , aspect ratio (length/width), area, perimeter	One-way ANOVA
Catelas et al. [10]	2001	Papain, proteinase K	Multiple sequential WCS (6 steps)	Resin embedding and slicing	TEM	700–1300	Length, width	One-way ANOVA
Brown et al. [4]	2007	Papain, proteinase K, yeast lytic enzyme, Zymolase®	Multiple sequential WCS (12 steps)	Sequential filtration	SEM	150	$d_{max}$	One-way ANOVA
Billi et al.	2011	Proteinase K, 37°C	Density gradient centrifugation (1 step)	Silicon wafer or TEM grid	SEM or TEM	Minimum 1000	$d_{min}$ , $d_{max}$ , P, A, ECD, FL, FB, FF, AR, E, R, shape and chemical composition distribution	Nonparametric tests

\* Particles isolated from tissue samples; WCS = washing/centrifugation/supernatant removal; TEM = transmission electron microscopy; SEM = scanning electron microscopy;  $d_{min}$  = minimum Feret's diameter;  $d_{max}$  = maximum Feret's diameter; P = perimeter; A = area; ECD = equivalent circle diameter; FL = fiber length; FB = fiber breadth; FF = form factor; AR = aspect ratio; E = elongation; R = roundness.

Figura 1. Tabla de revisión de los distintos métodos de digestión de suero de desgaste para el aislamiento de partículas metálicas. Billi *et al.* 2012

En esta tabla se recogen los tres métodos detectados en la búsqueda bibliográfica realizada en el marco del proyecto, los métodos de Catelas, Brown y Billi. Además de ellos se incluyen otros tres procedimientos anteriores a los ya encontrados.

Como podemos comprobar todos los métodos de digestión de suero y aislamiento de partículas metálicas, salvo el método de Tipper *et al.* de 1999[10], se basan en combinaciones de digestiones

enzimáticas/centrifugación/lavados que tiene como objetivo eliminar del medio todo residuo orgánico presente, conservando las partículas metálicas mediante centrifugación y/o ultracentrifugación.

### 3. REVISIÓN DE LA NORMATIVA ACTUALMENTE VIGENTE A NIVEL INTERNACIONAL

Es mucha la normativa vigente que hace referencia a la fabricación y evaluación de producto sanitario y de dispositivos implantables. Una parte de esta batería de normativas está especialmente dirigida a la evaluación de los dispositivos de sustitución protésica, siendo la norma ISO 17853 de 2011 “Wear of implant materials. Polymer and metal wear particles Isolation and characterization” [11] en la que se abordan los distintos métodos de aislamiento y caracterización de las partículas de desgaste de distinta naturaleza.

Esta norma se divide en dos partes bien diferenciadas aunque relacionadas. En la primera de ellas se abordan los métodos de aislamiento y caracterización de partículas de desgaste a partir de tejidos humanos. Estos métodos están claramente orientados a realizar un estudio del desgaste de las prótesis en casos concretos a partir de los tejidos retirados a un paciente con el objetivo de determinar la posible influencia del desgaste en el fracaso protésico o en algún efecto adverso observado en el paciente. Se lleva a cabo la distinción de procedimientos en función de los materiales que conformaban el par de desgaste de la prótesis utilizada: Metal-Polietileno y Metal-Metal.

La otra parte de la normativa presenta los procedimientos de aislamiento y análisis de partículas procedentes de sueros lubricantes utilizados en la simulación del desgaste protésico. Del mismo modo, se distinguen distintos procedimientos en función de la naturaleza del material de las partículas: partículas metálicas, de Polietileno y PEEK.

A pesar de las diferencias existentes entre ambas partes, relativas al origen de las partículas y a la “sustancia” contenedora de las mismas, existe una relación entre ambas respecto a la metodología general a seguir, la cual se basa en conseguir aislar las partículas de un medio orgánico mediante la digestión de los componentes orgánicos presentes y centrifugación para separar las partículas de los posibles residuos.

En el caso que nos ocupa prestaremos especial atención a los métodos de aislamiento contemplados en la parte de la normativa relativa al aislamiento de partículas metálicas de sueros de lubricación de máquinas de simulación de desgaste.

Del mismo modo que sucede en los protocolos encontrados en la búsqueda bibliográfica realizada, el método indicado por la norma se basa en una digestión enzimática del suero de desgaste, combinada con procesos de ultracentrifugación y lavados sucesivos. Cabe destacar que el método presentado por la norma, según se indica en la misma, está basado en el procedimiento de digestión y aislamiento elaborado por Catelas y colaboradores con ligeras modificaciones.

Tal y cómo se cita y justifica en la norma, al igual que en muchos artículos en bibliografía, la selección de un método enzimático está basada en el hecho de que digestiones del suero en medio ácido o básico afectan a la morfología y tamaño de las partículas metálicas, alterando los resultados y las conclusiones a alcanzar tras la caracterización de las mismas.

#### 4. OBTENCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS PATRÓN ENCONTRADOS EN BIBLIOGRAFÍA. SELECCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS MÁS ADECUADOS

Tras la revisión bibliográfica de la literatura más actual y la revisión de la normativa relativa a producto sanitario, más en concreto al desgaste de implantes, se han identificado al menos 8 procedimientos diferentes por los cuales es factible alcanzar un correcto aislamiento de partículas metálicas a partir de suero lubricante de máquinas de simulación de desgaste.

Por orden cronológico de publicación:

1. Schmiedberg, 1994
2. Doorn, 1998
3. Tipper, 1999
4. Catelas, 2001
5. Brown, 2007
6. Hallab, 2008
7. Billi, 2011
8. Norma ISO 17853 (Catelas modificado), 2011

De los 8 métodos descartamos los siguientes:

- Tipper, 1999 – Método de digestión básica. Según se ha descrito, tanto la digestión ácida como básica del líquido lubricante de desgaste puede afectar a la morfología de las de las partículas metálicas de aleación de CoCr. Es por ello que se desestima su puesta a punto.
- Hallab, 2008 – Método propio de digestión que difiere en algunos puntos respecto al resto de literatura. Método breve. Se corre el riesgo de la no eliminación completa de la parte orgánica del suero.
- Schmiedberg, 1994 y Doorn, 1998 – Son métodos similares a los más recientes de Catelas y Brown.
- Billi, 2011 – Método excesivamente breve con una sola digestión con Proteinasa K. Existe el riesgo de la no digestión completa del suero. Incluye una centrifugación en gradiente, la cual introduce una elevada selectividad al procedimiento de aislamiento, pero que en base a la experiencia precia del centro en aislamiento de partículas de PE mediante centrifugación en gradiente, puede suponer una posible fuente de error a la hora de cuantificar el número total de partículas (pérdida de partículas en el proceso de aislamiento de la fase concentrada del centrifugado)

Por tanto los métodos seleccionados para ser analizados en profundidad en el PT2 son los descritos por: Catelas y colaboradores (2001), Brown y colaboradores (2007) y el descrito en la norma ISO 17853 (2011)

#### 5. BIBLIOGRAFÍA CORRESPONDIENTE A LOS ENTREGABLES 1 Y 2

- [1] F. Billi, P. Benya, E. Ebramzadeh, P. Campbell, F. Chan, y H. A. McKellop, «Metal wear particles: What we know, what we do not know, and why», *SAS J*, vol. 3, n.º 4, pp. 133-142, dic. 2009.
- [2] Y. Liao, E. Hoffman, M. Wimmer, A. Fischer, J. Jacobs, y L. Marks, «CoCrMo Metal-on-Metal Hip Replacements», *Phys Chem Chem Phys*, vol. 15, n.º 3, ene. 2013.
- [3] R. Pourzal, I. Catelas, R. Theissmann, C. Kaddick, y A. Fischer, «Characterization of Wear Particles Generated from CoCrMo Alloy under Sliding Wear Conditions», *Wear*, vol. 271, n.º 9-10, pp. 1658-1666, jul. 2011.
- [4] I. J. Leslie, S. Williams, G. Isaac, E. Ingham, y J. Fisher, «High Cup Angle and Microseparation Increase the Wear of Hip Surface Replacements», *Clin Orthop Relat Res*, vol. 467, n.º 9, pp. 2259-2265, sep. 2009.
- [5] F. Billi, P. Benya, A. Kavanaugh, J. Adams, H. McKellop, y E. Ebramzadeh, «The John Charnley Award: An Accurate and Extremely Sensitive Method to Separate, Display, and Characterize Wear Debris Part 2: Metal and Ceramic Particles», *Clin Orthop Relat Res*, vol. 470, n.º 2, pp. 339-350, feb. 2012.

- [6] N. Hallab, A. Khandha, G. Malcolmson, y J. Timm, «In Vitro Assessment of Serum-Saline Ratios for Fluid Simulator Testing of Highly Modular Spinal Implants With Articulating Surfaces», *SAS J*, vol. 2, n.º 4, pp. 171-183, dic. 2008.
- [7] I. Catelas, J. D. Bobyn, J. B. Medley, J. J. Krygier, D. J. Zukor, A. Petit, y O. L. Huk, «Effects of digestion protocols on the isolation and characterization of metal–metal wear particles. I. Analysis of particle size and shape», *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 55, n.º 3, pp. 320–329, 2001.
- [8] I. Catelas, J. D. Bobyn, J. J. Medley, D. J. Zukor, A. Petit, y O. L. Huk, «Effects of digestion protocols on the isolation and characterization of metal–metal wear particles. II. Analysis of ion release and particle composition», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, n.º 3, pp. 330-337, jun. 2001.
- [9] C. Brown, S. Williams, J. L. Tipper, J. Fisher, y E. Ingham, «Characterisation of wear particles produced by metal on metal and ceramic on metal hip prostheses under standard and microseparation simulation», *J Mater Sci: Mater Med*, vol. 18, n.º 5, pp. 819-827, may 2007.
- [10] J. L. Tipper, P. J. Firkins, E. Ingham, J. Fisher, M. H. Stone, y R. Farrar, «Quantitative analysis of the wear and wear debris from low and high carbon content cobalt chrome alloys used in metal on metal total hip replacements», *J Mater Sci Mater Med*, vol. 10, n.º 6, pp. 353-362, jun. 1999.
- [11] «ISO 17853:2011 - Wear of implant materials -- Polymer and metal wear particles -- Isolation and characterization». [En línea]. Disponible en: [http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=57230](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=57230).