

**INFORME FINAL**

NOMBRE DEL ESTUDIO	PEI-243612 Desarrollo de dispositivos con base en Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas: Prueba de Hipersensibilidad retardada		
NÚMERO DE SOLICITUD	UNIPREC/17/044-2		
FECHA DE INICIO DE LA EJECUCIÓN DEL ESTUDIO	14/02/18	FECHA DE TÉRMINO DE LA EJECUCIÓN DEL ESTUDIO	30/03/18
DURACIÓN DEL ESTUDIO	98 días		
FECHA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	08/02/18		
FECHA DE RECEPCIÓN DEL PRODUCTO	16/02/18		
MEDICAMENTO DE REFERENCIA (cuando aplique)	N/A		
INVESTIGADOR PRINCIPAL/ DIRECTOR DE ESTUDIO	Héctor Rico Morales		
DIRECTORA DE LA UNIPREC	MA. ISABEL GRACIA MORA		
DIRECCIÓN Y TELÉFONO	UNIDAD DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL, CONJUNTO "D-E", FACULTAD DE QUÍMICA. CIRCUITO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA. CIUDAD UNIVERSITARIA. C.P. 04510. TEL. 5622-5375		
PATROCINADOR	Agustín Carrillo, Biograft de México, S.A. de C.V.		
DIRECCIÓN Y TELÉFONO	San Francisco 1103 Anexo A Planta Baja Col. Del Valle, Del. Benito Juárez, C.P. 03100. Tel. 55-5534-2648 Ext. 111.		

	Nombre	Puesto	Fecha	Firma
Elaboró	Héctor Rico Morales	Investigador principal/Director de estudio	18/04/18	
Revisó	Isabel Gracia Mora	Directora de la UNIPREC	19/04/18	
	Mabel Tinoco Méndez	Responsable de Aseguramiento de la Calidad		
Autorizó	Francisco Sánchez Bartéz	Responsable Sanitario/de Asuntos Regulatorios	20/04/18	



**PEI-243612 Desarrollo de dispositivos con base en Matriz Ósea
Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas: Prueba de
Hipersensibilidad retardada**



Índice

	Pág.
1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	4
3. Objetivo.....	5
4. Materiales y métodos.....	5
4.1 Producto de prueba.....	5
4.2 Preparación del producto prueba.....	5
4.3 Sistema de prueba.....	5
4.4 Justificación del sistema de prueba.....	5
4.5 Tamaño de muestra.....	6
4.6 Identificación de los animales	6
4.7 Condiciones de alojamiento y alimentación.....	6
4.8 Diseño experimental.....	6
4.9 Procedimientos terminales.....	8
5. Retención de registros, muestras y especímenes.....	8
6. Resultados.....	10
7. Conclusiones.....	13
8. Referencias.....	13
9. Anexos.....	14



1. RESUMEN

Se realizó la evaluación para determinar la hipersensibilidad del producto DBM NANO (matriz ósea desmineralizada), mediante la metodología descrita en la Guía ISO-10993 *Biological Evaluation of Medical Devices, Part. 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity*. Concluyendo que no se encontró evidencia de reacciones de sensibilización

2. INTRODUCCIÓN

La matriz ósea desmineralizada (DBM por sus siglas en inglés), es un hueso que se ha tratado químicamente para eliminar la parte mineralizada y mantener la matriz orgánica y los factores de crecimiento. Aproximadamente el 93% de la DBM consiste en colágeno, mientras que solo el 5% se compone de otros factores de crecimiento. Es débilmente osteoconductor porque las porciones orgánicas de hueso, como el colágeno, permanecen. Se ha comprobado la capacidad osteoinductora de dicha matriz en múltiples estudios, por lo que se ha utilizado para inducir la formación de hueso en diversas aplicaciones clínicas. Aunque, por otro lado, se ha considerado que la DBM no tiene rechazo inmunológico ya que la estructura superficial antigénica del hueso se destruye durante la desmineralización con ácido por otro lado, varios estudios han demostrado que cualquier aloinjerto óseo puede inducir respuestas inmunitarias del huésped a pesar de su tratamiento.

Por otro lado, la posibilidad de que un producto o dispositivo médico pueda provocar sensibilización cuando se pone en contacto en repetidas ocasiones en un paciente/individuo, para descartar tal reacción puede realizarse la prueba de hipersensibilidad retardada que evalúa la respuesta observada al aplicar un producto o dispositivo médico por vía dérmica en una especie relevante como el cobayo. Se basa en la inducción de la específica mediada por células T de memoria inmunológica de un alérgeno al que está expuesto un individuo, lo que resulta en una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado después del segundo contacto con el alérgeno.

Es una prueba predictiva y no excluye la posibilidad de validar los resultados con datos obtenidos en análisis de datos epidemiológicos, otras pruebas dermatológicas, y/o monitoreo de reclamaciones del producto.

Por lo anterior y ante el creciente desarrollo y evolución de productos innovadores, se reconoce la importancia de efectuar pruebas y procedimientos de evaluación para garantizar su biocompatibilidad y seguridad, para posteriormente solicitar y obtener su registro ante la autoridad regulatoria correspondiente.



3. OBJETIVO

Evaluar la reacción localizada de sensibilización cutánea, de la elución del producto de prueba DBM NANO (matriz ósea desmineralizada).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Producto de prueba

DBM-NANO (Matriz ósea desmineralizada), del fabricante Biograft de México S.A. de C.V.

4.2 Preparación del producto de prueba

Para la preparación de la elución del producto de prueba, se utilizó la guía ISO 10993-10:2012 y al Procedimiento Normalizado de Operación para los estudios de seguridad de dispositivos médicos (PNODM-UNAM-UNIPREC-01).

La muestra se preparó dentro de la campana de flujo laminar CFCC-UNIPREC-01 para garantizar la esterilidad del producto y su elución. Se usó la relación de 0.2 g del material de prueba por mililitro de disolvente. Por lo que, se utilizaron 22 g del producto de prueba equivalentes a 22 cc y se pusieron en una botella de medio de cultivo de 500 mL estéril marca Corning con número de lote 31415012 y fecha de caducidad de 10/11/18, con 110 mL de solución salina fisiológica isotónica estéril al 0.9% marca PiSA con número de lote D16Y496 y fecha de caducidad de mayo/19, y se colocaron en la incubadora ININ-UNIPREC-01 a 37°C por un periodo de 72 horas. Posteriormente de la elución se tomaron alícuotas de 27.5 mL en tubos de centrifuga de 50 mL marca Corning con número de lote 30716079 y fecha de caducidad de 01/11/21, para usarse por cada semana de administración y en la fase de desafío, almacenándose en el refrigerador RECF-UNIPREC-01 para ser utilizados conforme se fueron requiriendo. Lo anterior se registró en la BAP-UNAM-UNIPREC-03.

4.3 Sistema de prueba

Se emplearon cobayos machos adultos jóvenes y sanos, de entre 300 a 500 g al inicio del estudio, dichos animales contaron con su respectivo certificado de salud y reporte microbiológico.

4.4 Justificación del sistema de prueba

El estudio se realizó de acuerdo a la Guía ISO-10993 *Biological Evaluation of Medical Devices, Part. 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity* y al Procedimiento Normalizado de Operación para los estudios de seguridad de dispositivos médicos (PNODM-UNAM-UNIPREC-01).



4.5 Tamaño de Muestra

Se utilizaron 15 cobayos Hartley.

4.6 Identificación de los animales

Los animales se identificaron con numeración consecutiva: para el grupo del producto de prueba numeración del 1-10 y del grupo control del 11 al 15, mediante marcado con marcador indeleble en la región sacra de acuerdo al Procedimiento Normalizado de Operación para el Manejo de Animales PNOMA-UNAM-UNIPREC-01.

4.7 Condiciones de alojamiento y alimentación

Los animales se alojaron dentro del área de Experimentación Animal de la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC), que cuenta con la autorización de SAGARPA/SENASICA AUT-B-B0314-010, en la sala 1 cumpliendo el tiempo de cuarentena de al menos 10 días, durante el cual se revisaron diariamente para observar su estado de salud, una vez cumplido dicho tiempo los animales se cambiaron a la sala 2 para iniciar con la ejecución del estudio y cumpliendo con lo señalado en la NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio", se colocaron a razón de 5 animales por jaula con las siguientes dimensiones: 0.75 x 0.55 x 0.25 m. y bajo condiciones ambientales controladas como "Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio",: extracción e inyección de aire con al menos 18 recambios por hora mediante filtros HEPA, los cuales filtran partículas de hasta de 3 μm en el aire de inyección, temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un porcentaje de humedad relativa de entre 40-70% y ciclos de luz oscuridad de 12/12 h. Para su registro se utilizaron los formatos correspondientes a los procedimientos normalizados de operación del proceso de verificación, calibración, calificación y mantenimiento preventivo (PNOVC-UNAM-UNIPREC-01).

Por otro lado, se les proporcionó alimento Guinea Pig Chow 5025 *ad libitum* con número de lote OCT10173 y fecha de caducidad de jul/18, cama Pine Shavings Bedding marca Envigo y agua purificada por filtración *ad libitum* del Centro UNAM-ENVIGO, los bebederos se esterilizaron en la autoclave AUAE-UNIPREC-01.

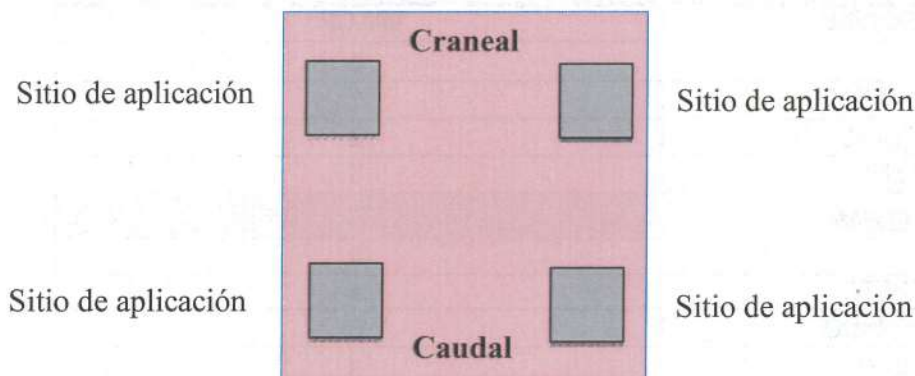
4.8 Diseño experimental

El estudio se realizó conforme al Procedimiento Normalizado de Operación para la prueba de hipersensibilidad retardada por el método de Buehler PNOHS-UNAM-UNIPREC-01.



Se utilizaron 2 grupos experimentales: un grupo control con 5 animales y otro grupo de la elución del producto de prueba con 10 animales. Un día antes de iniciar la prueba se llevó a cabo el rasurado de los animales, en un área de aproximadamente de 4 a 6 cm de ancho, en la región dorso-lateral, evitando causar lesiones o irritaciones en la piel antes de la prueba para no interferir con los resultados finales de la misma.

Se aplicó vía cutánea al grupo control el agua inyectable estéril marca PiSA con No. de lote R16T73 y fecha de caducidad de oct/19, a un volumen de 0.5 mL/sitio en ambos costados de los 5 cobayos de la siguiente manera:



De la misma manera, al grupo de prueba se aplicó vía cutánea la elución del producto de prueba a una dosis de 0.5 g/sitio en ambos costados de los 10 cobayos (ver Cuadro 1).

Cuadro 1. Relación de dosificación

Grupos	No. de animales	No. de sitios/animal	Dosis y vía administración
Prueba (elución del producto de prueba)	10 cobayos	4	0.5 mL/sitio, vía cutánea
Control (agua inyectable)	5 cobayos	4	0.5 mL/sitio, vía cutánea

Posteriormente se cubrieron los sitios de aplicación con un parche de gasa de algodón estéril, después de 6 horas se retiraron, se lavó la zona de aplicación con ayuda de una gasa y agua purificada por filtración. Esta fase de inducción se realizó durante tres días consecutivos por tres semanas, dicho procedimiento se llevó a cabo para ambos grupos (producto de prueba y control).

Posteriormente se realizó la fase de desafío 15 días después, donde se retaron a todos los animales del grupo de prueba con la aplicación en una sola ocasión de la elución del producto de prueba, así como los del grupo control con el agua inyectable, y se les colocó su respectivo parche de gasa, pasadas 6 horas se retiraron los parches y se lavaron los sitios de aplicación en ambos grupos.



A las 24 y 48 horas post-administración se examinaron los sitios para detectar cualquier tipo de evidencia de reacción tisular como eritema y edema, según la escala de Magnusson-Kligman (Cuadro 2). Las actividades se registraron en la BAP-UNAM-UNIPREC-03 y la evaluación en el formato evaluación de la prueba de hipersensibilidad retardada (FHR-UNAM-UNIPREC-01).

Cuadro 2. Evaluación de las reacciones en la piel (Valores Magnusson/Kligman)

TABLA DE VALORES MAGNUSSON/KLIGMAN:	
ERITEMA:	VALOR
SIN ERITEMA	0
ERITEMA DISCRETO	1
ERITEMA MODERADO	2
ERITEMA INTENSO	3
EDEMA:	
SIN EDEMA	0
EDEMA DISCRETO	1
EDEMA MODERADO	2
EDEMA INTENSO	3

(1) Excluye edemas no inflamatorios (mecánicos) del blanco o líquido de extracción.

Interpretación

Según la escala Magnusson-Kligman se registraron los resultados del ensayo y se presentan como la frecuencia de positivos en los grupos tratados y de control, si por lo menos en un caso se presenta un positivo, se considera positiva la prueba.

4.9 Procedimientos terminales

Terminado el estudio se aplicó la eutanasia en los animales con sobredosis de anestesia, utilizando 1 mL de pentobarbital sódico marca Sedalpharma con número de lote 17085 SP y fecha de caducidad de mar/20, y los cadáveres se enviaron al congelador del área de residuos COAR-UNIPREC-01, para su posterior disposición.

5. RETENCIÓN DE REGISTROS, MUESTRAS Y ESPECÍMENES

El manejo de la documentación generada durante el estudio se llevó a cabo conforme lo indica el Manual de control de documentos y registros (MDR-UNAM-UNIPREC-01) y el Procedimiento para el manejo de la documentación de los protocolos preclínicos (PDP-UNAM-UNIPREC-01).



UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA
UNIPREC

Página: 9 De:15

La documentación se archivó en el expediente de análisis preclínico (EAP).
El EAP será resguardado por el archivista en el área de archivo de acuerdo al Procedimiento para el manejo de archivo (PMA-UNAM-UNIPREC-01). Los documentos electrónicos quedarán resguardados en una nube virtual de uso exclusivo de la UNIPREC. El periodo de resguardo será por un periodo mínimo de cinco años. Al finalizar este tiempo el EAP y los materiales que apliquen serán entregados al Patrocinador quien lo conservará por el tiempo que juzgue pertinente.

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA
UNIPREC

Página: 10 De:15

6. RESULTADOS

A continuación, se presenta el formato de resultados de la prueba de hipersensibilidad retardada FHR-UNAM-UNIPREC-01.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO		UNIPREC							
FORMATO DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA MEDIANTE LA PRUEBA DE BUEHLER PARCHES CERRADOS									
PRODUCTO: DERMATO (Biotec Químicos Dermatológicos)		No. DE LOTE							
PRESENTACIÓN: Jarabe		No. DE SOLUCIÓN UNIPREC-01/04/2							
FABRICANTE: Biotec de México S.A. de C.V.		FECHA DE RECEPCIÓN: 14/01/18							
FECHA DE ELABORACIÓN: 14/01/18		FECHA DE INICIO DE PRUEBA: 14/01/18							
FECHA DE TÉRMINO DE PRUEBA: 20/01/18									
ANIMALES DE PRUEBA									
COBAYO 1		COBAYO 2		COBAYO 3		COBAYO 4		COBAYO 5	
FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA
EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA
COBAYO 6		COBAYO 7		COBAYO 8		COBAYO 9		COBAYO 10	
FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA
EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA
ANIMALES CONTROL									
COBAYO 11		COBAYO 12		COBAYO 13					
FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA	FECHA				
EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA	EDMA				
COBAYO 14		COBAYO 15							
FECHA	FECHA	FECHA	FECHA						
EDMA	EDMA	EDMA	EDMA						
TABLA DE VALORES MAGNITUDINAL:									
ERITEMA:	VALOR								
SIN ERITEMA	0								
ERITEMA DISCRETO	1								
ERITEMA MODERADO	2								
ERITEMA INTENSO	3								
EDEMA:	VALOR								
SIN EDEMA	0								
EDEMA DISCRETO	1								
EDEMA MODERADO	2								
EDEMA INTENSO	3								
OBSERVACIONES:									
Sin observaciones									
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:									
FECHA	VALOR	INTERPRETACIÓN							
14/01/18	0	SIN SENSIBILIZACIÓN							
20/01/18	2	NO SENSIBILIZACIÓN							
INTERPRETACIÓN:									
Sin sensibilización									
Firma: [Firma]									



A continuación, se muestran imágenes fotográficas representativas por cobayo y por tiempo:

A las 24 h

Grupo de prueba



[Firma manuscrita]

Grupo de control



[Firma manuscrita]



A las 48 hrs.

Grupo de prueba



Cobayo 2



Cobayo 3



Cobayo 6



Cobayo 10

Grupo de control



Cobayo 11



Cobayo 12



9. ANEXOS

Los que se incluyen en el protocolo, así como el formato de registro de enmiendas FREM-UNAM-UNIPREC-01.

Declaración del investigador principal/director de estudio

El estudio se realizó bajo un Sistema de Gestión de la Calidad que asegura las BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO registro BPL 02/15 (EMA/OCDE) y en instalaciones autorizadas por SAGARPA/SENASICA, clave AUT-B-B-0314-010 y de acuerdo al protocolo aprobado y a los Procedimientos Normalizados de Operación de la UNIPREC.

Como investigador principal/director de estudio asumo la responsabilidad de que este estudio se realizó cumpliendo estrictamente los principios de las buenas prácticas de laboratorio.

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL / DIRECTOR DE ESTUDIO

Héctor Rico Morales

Declaración del responsable de aseguramiento de calidad

Durante la ejecución del estudio "PEI-243612 Desarrollo de dispositivos con base en Matriz Ósea Desmineralizada incorporando nanopartículas bioactivas: Prueba de Hipersensibilidad retardada", UNIPREC/17/044-3, se llevaron a cabo diferentes inspecciones y los resultados de éstas fueron comunicadas a la Dirección de la UNIPREC, así como al Investigador principal/director de estudio en las siguientes fechas:

Fecha de inspección	Etapas inspeccionadas	Fecha de reporte de hallazgos
11/12/17	Revisión del protocolo	11/12/17
27/02/18	Inspecciones al estudio - sistema de prueba (administración de la elución)	27/02/18
19/04/18	Inspecciones al estudio – datos crudos (Bitácora BAP-UNAM-UNIPREC-03, formato FHR-UNAM-UNIPREC-01)	19/04/18
19/04/18	Revisión del informe final	19/04/18



7. CONCLUSIONES

Después de realizar la prueba de hipersensibilidad retardada y de revisar todos los sitios de aplicación y a los diferentes tiempos, no se observaron reacciones de eritema y edema. Por lo que se concluye que el producto de prueba DBM-NANO (Matriz ósea desmineralizada), tiene como resultado Sin Sensibilización.

8. REFERENCIAS

- ISO 10993-10 2006, Biological Evaluation of Medical Devices.
- Procedimiento Normalizado de Operación para la prueba de hipersensibilidad retardada por el método de Buehler PNOHS-UNAM-UNIPREC-01.
- ISO 10993-1:2006 Biological evaluation of medical devices, Part 12. Sample preparation and reference.
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science 1965; 150:883-99. 5.
- Tuli S., Singh A. The osteoinductive property of decalcified bone matrix: an experimental study. J. Bone Joint Surg. Br. 1978; 60B:116-23. 6.
- Gepstein R., Weiss R., Saba K, Aviv R.: Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a power. J Bone Joint Surg. Am. 1987; 69A:984-92. 7.
- Sanhu HS, Khan SN, Suh DY, Boden SD. Demineralized bone matrix, bone morphogenetic proteins, and animal models of spine fusion: an overview. Eur. Spine J. 2001; 10: S122-S131.
- Tilkeridis K., Touzopoulos P., Ververidis A., Christodoulou S., Kazakos K., Drosos G.; Use of demineralized bone matrix in spinal fusion; World Journal of Orthopedics, 2104 Jan. 18 5(1): 30-37.



UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA
UNIPREC

Página: 15 De:15

Por todo lo anterior se confirma que el informe final refleja fielmente los datos crudos obtenidos durante la ejecución del mismo.

NOMBRE Y FIRMA DEL RESPONSABLE DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

Mabel C. Tinoco Méndez

FINALIZACIÓN DEL ESTUDIO:

Héctor Rico Morales  23/05/18
(NOMBRE, FIRMA Y FECHA DEL INVESTIGADOR
PRINCIPAL/DIRECTOR DE ESTUDIO)

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{1}{2} m v^2 \right) = \frac{d}{dt} \left(\frac{1}{2} m \frac{dx}{dt} \frac{dx}{dt} \right) = m \frac{dx}{dt} \frac{d^2 x}{dt^2}$$

$$= \frac{d}{dt} \left(\frac{1}{2} m \frac{dx}{dt} \frac{dx}{dt} \right) = \frac{d}{dt} \left(\frac{1}{2} m \frac{dx}{dt} \frac{dx}{dt} \right) = \frac{d}{dt} \left(\frac{1}{2} m \frac{dx}{dt} \frac{dx}{dt} \right)$$