



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

RESPUESTA INFLAMATORIA Y  
REPARACIÓN DEL TEJIDO CONECTIVO  
FRENTE A IMPLANTES DE TITANIO Y  
NANOHIPOXIPATITA PRODUCIDOS  
MEDIANTE FRICCIÓN BATIDA, EN  
RATONES (*Mus musculus*)

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA

JHONATAN SIMÓN CHURATA QUISPE

LIMA - PERÚ

2018



## **ASESORES**

**Dra. Esp. Lidia Yileng Tay Chu-Jon**

Departamento Académico de la Clínica Estomatológica

**Mg. Esp. Carlos Vladimir Espinoza Montes**

Departamento Académico de Medicina y Cirugía Bucomaxilofacial

## **DEDICATORIA**

A mis abuelos que ya no están.

## AGRADECIMIENTO

- A mis asesores por su importante apoyo.
- Al “Círculo de Investigación e Innovación de Materiales Avanzados para la Industria y Biomedicina”, de Convenio de Financiamiento N° 011-2014-FONDECYT; que fue pieza clave para la elaboración de los especímenes evaluados.
- A Sandra Bezada Quintana, médico veterinaria, y Emil Correa Quispilaya, cirujano dentista especialista en periodoncia e implantes; cuyo apoyo durante la ejecución de la investigación fue fundamental para su desarrollo.

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la respuesta inflamatoria y reparación del tejido conectivo frente a implantes de titanio (Ti) y nanohidroxiapatita (nHA) producidos mediante Fricción Batida (FB), en ratones (*Mus musculus*). **Material y métodos:** 20 implantes de 4x5x2mm (10 implantes de Ti y nHA elaborados mediante FB (experimentales) y 10 implantes de Ti sin nHA (controles)) fueron colocados en el tejido conectivo de la piel de lomo de 10 ratones, uno experimental y uno control en cada ratón. El sacrificio se realizó a los 14 y 28 días, obteniendo el tejido alrededor de los implantes para ser procesados en láminas histopatológicas con coloración hematoxilina-eosina. Mediante el microscopio óptico se analizó la cantidad de células características de la inflamación y reparación. Se utilizó la prueba de Fisher para comparar la respuesta del tejido conectivo alrededor de los implantes controles y experimentales. **Resultados:** No se encontró diferencia estadísticamente significativa a los 14 días ( $p = 1$ ) y 28 días (no se calculó la prueba de Fisher porque los valores fueron constantes). **Conclusiones:** Se encontró que los implantes experimentales que se obtuvieron mediante FB tuvieron una respuesta del tejido conectivo similar a los especímenes de titanio que se utilizaron como controles.

**PALABRAS CLAVE:** Titanio, Hidroxiapatita, Tejido Conectivo, Ensayo de Materiales.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the inflammatory response and repair of connective tissue against titanium (Ti) and nanohydroxyapatite (nHA) implants produced by Whipped Friction (FB), in mice (*Mus musculus*). **Material and methods:** 20 implants of 4x5x2mm (10 implants of Ti and nHA made by means of FB (experimental) and 10 implants of Ti without nHA (controls)) were placed in the connective tissue of the skin of the back of 10 mice, one experimental and one control on each mouse. The sacrifice was made at 14 and 28 days, obtaining the tissue around the implants to be processed in histopathological sheets with hematoxyllin-eosin staining. The number of cells characteristic of inflammation and repair was analyzed using optical microscopy. The Fisher's test was used to compare the response of the connective tissue around the control and experimental implants. **Results:** No statistically significant difference was found at 14 days ( $p = 1$ ) and 28 days (Fisher's test was not calculated because the values were constant). **Conclusions:** We found that the experimental implants that were obtained by FB had a connective tissue response similar to the titanium specimens that were used as controls.

**KEY WORDS:** Titanium, hydroxyapatite, Connective Tissue, Materials Testing.

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Respuesta inflamatoria y reparación según la presencia de nHA a los 14 días	37
<b>Tabla 2.</b> Respuesta inflamatoria y reparación según la presencia de nHA a los 28 días	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Procesamiento de Rociado por Plasma.	12
<b>Figura 2.</b> Procesamiento de Fricción Batida.	14
<b>Figura 3.</b> Especimen comparado con una sonda periodontal.	27
<b>Figura 4.</b> Dimensiones de los especímenes.	27
<b>Figura 5.</b> Zona operatoria donde fueron realizadas las incisiones.	32
<b>Figura 6.</b> Tejido circundante a los especímenes obtenido del lomo del ratón.	32

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>HA</b>	:	Hidroxiapatita
<b>nHA</b>	:	Nanohidroxiapatita
<b>UPCH</b>	:	Universidad Peruana Cayetano Heredia
<b>PUCP</b>	:	Pontificia Universidad Católica del Perú
<b>INS</b>	:	Instituto Nacional de Salud del Perú
<b>FB</b>	:	Fricción Batida
<b>RP</b>	:	Rociado por Plasma
<b>G</b>	:	Unidad Gauge (calibre de aguja)
<b>°C</b>	:	Grados Celsius
<b>cm</b>	:	Centímetros
<b>mm</b>	:	Milímetros
<b>min</b>	:	Minuto
<b>g</b>	:	Gramos
<b>kg</b>	:	Kilogramos
<b>mg</b>	:	Miligramos

<b>kgf/cm<sup>2</sup></b>	:	Kilogramo-fuerza/centímetro cuadrado
<b>mL</b>	:	Mililitros
<b>rpm</b>	:	Revoluciones por minuto
<b>PMNs</b>	:	Polimofonucleares
<b>Ti</b>	:	Titanio
<b>Sr</b>	:	Estroncio
<b>Ti6Al4V</b>	:	Aleación Alfa-Beta de Titanio con 6% de Aluminio y 4% de Vanadio
<b>CONCYTEC</b>	:	Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica
<b>FONDECYT</b>	:	Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica
<b>ASTM</b>	:	American Society for Testing and Materials
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	:	Nitrato de plata
<b>Ag</b>	:	Plata
<b>MG-63</b>	:	Células de osteosarcoma humano

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>Pág.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN</b>	2
II.1.    Planteamiento del problema	2
II.2.    Justificación	3
<b>III. MARCO TEÓRICO</b>	4
<b>IV. OBJETIVOS</b>	19
IV.1.    Objetivo general	19
IV.2.    Objetivos específicos	19
<b>V. HIPÓTESIS</b>	20
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	21
VI.1.    Diseño de estudio	21
VI.2.    Muestra	21
VI.3.    Criterios de selección	21
VI.3.1.    Criterios de inclusión	20
VI.4.    Variables	22
VI.5.    Técnicas y procedimientos	25
VI.6.    Plan de análisis	35
VI.7.    Consideraciones éticas	35
<b>VII. RESULTADOS</b>	36
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	39
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	43
<b>X. REFERENCIAS</b>	44
<b>ANEXOS</b>	54

## I. INTRODUCCIÓN

La oseointegración es un factor importante para el éxito del tratamiento con implantes dentales; para lograrla, el implante requiere de un tratamiento de superficie con la finalidad de favorecer la adhesión a la superficie, diferenciación y proliferación celular. Son varios los métodos empleados para tal fin; se han descrito métodos mecánicos, químicos y físicos para el tratamiento de superficie de implantes dentales de titanio (Ti). Dentro de los métodos físicos, está el de Rociado por Plasma (RP) que es uno de los más usados para el recubrimiento con hidroxiapatita (HA). La HA ha demostrado propiedades biológicas favorables, mejorando y acelerando el proceso de oseointegración. Sin embargo, se han reportado complicaciones clínicas con este tipo de recubrimiento en implantes dentales.

Otro método, dentro de los físicos, es el de Fricción batida (FB), con el que se logra formar compuestos de Ti y nanohidroxiapatita (nHA), pero aún faltan estudios para demostrar que pueden mejorar la oseointegración, así como estudios que evalúen la respuesta de los tejidos vivos involucrados durante el proceso de cicatrización.

Ante estas interrogantes se planteó esta investigación que tuvo como objetivo determinar la respuesta inflamatoria y reparación del tejido conectivo frente a compuestos de aleación de Ti y nHA producidos mediante FB, en ratones (*Mus musculus*).

## II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

### II.1. Planteamiento del problema

Diferentes tratamientos de superficie en los implantes dentales buscan una mejor manera de favorecer la oseointegración. La HA es utilizada para tal fin como recubrimiento de superficies, en su mayoría aplicada con el método de RP. Con el desarrollo de la nanotecnología, se han desarrollado métodos para que la superficie en contacto con el hueso posea nHA, entre ellos están la FB que tiene como ventaja formar un solo compuesto entre dos biomateriales.

Los estudios de la respuesta tisular *in vivo* de implantes desarrollados con este método de elaboración de compuestos son una prueba importante ya que muchos aspectos de las respuestas biológicas clínicas actualmente no pueden ser demostrados mediante estudios *in vitro*, incluyendo las interacciones con los tejidos, la cicatrización de heridas, infecciones, respuestas de hipersensibilidad, la carcinogénesis y la inflamación crónica, entre otros.

Por tal motivo surge la pregunta ¿Será la respuesta inflamatoria y reparación del tejido conectivo, frente a implantes de Ti y nHA producidos mediante FB similar o mejor a la de implantes de Ti sin nHA?

## **II.2 Justificación**

Las propiedades biológicas de la HA son conocidas, pero existe una controversia en cuanto a cuál método puede resultar conveniente para su aplicación en implantes dentales de Ti. Se están desarrollando nuevos métodos para lograr el recubrimiento con nHA sobre la superficie de los implantes, y en el mejor de los casos formar un solo compuesto de Ti y nHA. Esta investigación busca determinar cuál es la respuesta del tejido conectivo alrededor de implantes de Ti procesados con el método de FB para la formación de un implantes de Ti y nHA, siendo un paso importante ante la búsqueda de una nueva alternativa en implantes dentales.

Esta investigación aportará nuevos conocimientos acerca de la respuesta que se da en el tejido conectivo luego de la colocación a nivel subcutáneo de implantes de Ti y nHA obtenidos mediante FB en comparación con implantes de Ti sin nHA. Esta investigación *in vivo* fue realizada en ratones (*Mus musculus*) y se evaluó a los 14 y 28 días; teniendo en cuenta los eventos fisiológicos del proceso de inflamación y reparación luego de la colocación de implantes.

### III. MARCO TEÓRICO

#### **Biocompatibilidad**

La biocompatibilidad se define como la capacidad de un material para generar una apropiada respuesta del hospedero en una situación específica<sup>1</sup>.

En general, la biocompatibilidad de un material con el tejido circundante puede ser descrita mediante las respuestas biológicas; es decir, en términos de las respuestas inflamatorias agudas y crónicas, y la formación de una cápsula fibrosa que se ve en distintos periodos después de la implantación.<sup>2</sup> Para ello, estudios *in vitro* e *in vivo* (en animales) son realizados para la medición de las respuestas biológicas; estas pruebas se dan para que un biomaterial pueda ser utilizado en humanos en pruebas clínicas<sup>3</sup>.

Las pruebas *in vitro* se realizan fuera de un organismo, utilizando cultivos de células o componentes celulares. En su forma más sofisticada, las pruebas *in vitro* utilizan múltiples células, barreras, o condiciones de cultivo especiales para tratar de reproducir las condiciones *in vivo*<sup>4</sup>.

Muchos aspectos de las respuestas biológico clínico no pueden actualmente ser demostrados mediante ensayos *in vitro*, incluyendo las interacciones con los tejidos, la cicatrización de heridas, infecciones, reacciones de hipersensibilidad, la carcinogénesis y la inflamación crónica, entre otros.<sup>4</sup> La experimentación animal ofrece información sobre este tipo de efectos, sin poner en riesgo a los humanos. Los estudios en animales pueden ser estructurados para imitar el uso clínico en humano,

en algún grado. Son generalmente menos costosos que los ensayos clínicos en humanos, se pueden completar más rápidamente en muchos casos, y pueden ser controlados a un grado mayor. Los ensayos con animales se pueden usar para determinar respuestas tales como: la cicatrización post-trauma, la formación de hueso, o dentinogénesis, que son difíciles o imposibles de probar en seres humanos<sup>5</sup>.

### **Respuesta inflamatoria**

La inflamación es una respuesta protectora del organismo contra la invasión de componentes extraños. Sin embargo, la implantación de un biomaterial puede resultar en la persistencia del proceso inflamatorio con el fin de eliminar el material extraño, desencadenando efectos negativos que lleven a extensos daños tisulares<sup>6</sup>.

La inflamación aguda es definida como una respuesta biológica a un agente nocivo involucrando a los leucocitos y es relativamente de corta duración, pudiendo ocurrir en minutos a días dependiendo de la extensión de la injuria. La inflamación aguda posee tres componentes principales: 1) alteraciones en el flujo y calibre vascular (vasodilatación). 2) alteraciones estructurales en la microcirculación, permitiendo que las proteínas plasmáticas y leucocitos dejen la circulación, reduciendo la presión osmótica vascular, y aumentando el fluido intersticial. 3) migración de leucocitos de la circulación para el foco de la lesión frente a una gradiente quimiotáctica y su activación para la eliminación del agente agresor<sup>6</sup>.

La inflamación crónica, es una reacción prolongada (varios días, semanas o meses) con una ocurrencia simultánea de inflamación activa, destrucción e intento de

reparación tisular, pudiendo ser debido a infecciones persistentes o a exposición continua a agentes potencialmente tóxicos/irritantes. La inflamación crónica se caracteriza por el infiltrado de células mononucleares, macrófagos y diferentes subpoblaciones de linfocitos, destrucción tisular inducida por la persistencia de agentes nocivos o la acción de células inflamatorias y el intento de cicatrización con la proliferación de vasos sanguíneos y sustitución de tejido dañado por tejido fibroso<sup>6</sup>.

La respuesta inflamatoria crónica a los biomateriales es localizada y puede darse de dos maneras. La inflamación con presencia de células mononucleares, incluyendo linfocitos y células plasmáticas, se le da la designación de inflamación crónica; mientras que a la reacción a cuerpo extraño con el desarrollo de tejido de granulación, se considera la curación normal de la herida como respuesta a biomateriales implantados (es decir, la reacción normal de cuerpo extraño). En este caso la posibilidad de la incompatibilidad del material con el tejido puede ser posible<sup>5</sup>.

### **Reparación**

Los primeros estadios de la reparación efectiva tisular son: la depuración del detritus oriundo de los daños tisulares, células necróticas y apoptóticas por las células macrofágicas, liberando el camino hacia la reparación. Ese papel es ampliamente desenvuelto por los macrófagos que también liberan enzimas, proteinasas, colagenasas, elastasa y hialurosina para que ocurra la reorganización tisular<sup>6</sup>.

Un día luego de la implantación de un biomaterial, la respuesta de curación se inicia por la acción de los monocitos y macrófagos, seguida por la proliferación de los fibroblastos y las células endoteliales vasculares en el sitio del implante, lo que lleva a la formación de tejido de granulación, el sello distintivo de la curación de la inflamación. El término de tejido de granulación se deriva del aspecto granular rosa en la superficie de la curación de heridas, y sus rasgos histológicos característicos incluyen la proliferación de nuevos vasos sanguíneos pequeños y fibroblastos. Dependiendo de la extensión de la lesión, el tejido de granulación puede verse tan pronto como tres a cinco días después de la implantación de un biomaterial<sup>5</sup>.

Los nuevos vasos sanguíneos se forman por gemación o aparición de brotes de los vasos preexistentes en un proceso conocido como angiogénesis o neovascularización<sup>7,8</sup>. Este proceso implica la proliferación, la maduración, y la organización de las células endoteliales en los tubos capilares. Los fibroblastos proliferan también en el desarrollo de tejido de granulación y son activos en la síntesis de colágeno y proteoglicanos. En las primeras etapas de desarrollo de tejido de granulación (Tejido de granulación inmaduro), los proteoglicanos predominan; después (Tejido de granulación maduro) el colágeno, especialmente colágeno de tipo I, predomina y forma la cápsula fibrosa, donde algunos fibroblastos en el desarrollo de tejido de granulación pueden tener características de las células musculares lisas. La respuesta de curación de la herida depende en general de la extensión o grado de lesión o defecto creado por el procedimiento de implantación<sup>5</sup>.

La reacción de cuerpo extraño, que consiste principalmente en los macrófagos y/o células gigantes de cuerpo extraño, puede persistir en la interfase implante de tejido durante la vida útil del implante<sup>9-11</sup>.

Generalmente, la fibrosis (es decir, la encapsulación fibrosa) rodea el biomaterial o implante con su reacción a cuerpo extraño interfacial, aislando la reacción del implante y cuerpo extraño desde el entorno del tejido local. Desde una etapa temprana la respuesta inflamatoria activa la adherencia de los macrófagos sobre la superficie del material. Aunque en general se considera que las propiedades químicas y físicas de la biomaterial son responsables de la activación de macrófagos, la naturaleza de los acontecimientos posteriores en relación con la actividad de los macrófagos en la superficie no está clara. Los macrófagos tisulares, derivados de monocitos circulantes en la sangre, pueden unirse para formar células gigantes de cuerpo extraño multinucleadas. Células gigantes de cuerpo extraño muy grandes contienen un gran número de núcleos están típicamente presentes en la superficie de biomateriales. Aunque estas células gigantes de cuerpo extraño pueden persistir durante toda la vida útil del implante, no se sabe si permanecen activados, liberando sus constituyentes lisosomales, o manteniéndose en reposo<sup>5</sup>.

## **Implantes dentales de Ti y tratamiento de superficie**

La selección de materiales para implantes dentales se basa en las propiedades mecánicas, propiedades químicas y la biocompatibilidad. Sin importar el papel y el lugar de la aplicación de los implantes dentales, los materiales deben tener buena resistencia a la corrosión, biocompatibilidad y estar libre de elementos tóxicos. Actualmente, el titanio y sus aleaciones cumplen con estas características como material en la fabricación de implantes dentales; siendo el Ti de grado 5 uno de los empleados para la elaboración de implantes oseointegrados<sup>12-14</sup>.

Los oseointegración que es definida como un proceso biológico en el que se consigue la fijación rígida clínicamente asintomática de materiales aloplásticos y mantenido en el hueso durante la carga funcional<sup>15</sup>. El tratamiento de la superficie del implante es un factor importante en la oseointegración<sup>16</sup>, y puede ser realizado mediante el cambio de su topografía o incorporando materiales bioactivos como recubrimiento<sup>17</sup>, estos propósitos pueden conseguirse con métodos químicos, mecánicos y/o físicos<sup>18</sup>.

La HA ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) es un compuesto que se encuentra presente normalmente en el diente y los huesos. Puede conducir a la formación de hueso rápidamente y a la fijación biológica sólida de tejido óseo debido a que es un material bioactivo y presenta propiedades osteoconductoras. Es un fosfato de calcio estable con valores de pH entre 4 y 12 bajo temperaturas normales. Muestra biocompatibilidad excepcional con tejidos duros; piel y tejidos musculares. Debido a estas propiedades es utilizada

para la construcción de rellenos óseos o como un revestimiento sobre implantes protésicos para mejorar la incorporación del implante con el hueso huésped<sup>19-28</sup>.

Por otro lado, las partículas nanométricas de HA (nHA) son similares a la HA nanocristalina que se encuentra en el hueso natural. La proliferación celular puede verse afectada por el tamaño de partículas. Las partículas más pequeñas (<100 nm) son deseables debido a que contribuyen a una mejor adhesión interfase hueso-implante, el crecimiento y la adhesión celular<sup>29</sup>.

Estudios han reportado que las superficies nanométricamente controladas tienen un gran efecto en la adsorción de proteínas, la formación de coágulos de sangre, y las respuestas celulares que se dan tras la colocación de los implantes dentales. Estos eventos tempranos tienen un impacto efectivo sobre la migración, adhesión y la diferenciación de las células madre mesenquimales. A pesar de la investigación en implantes dentales, la superficie ideal para lograr una integración del implante al tejido vivo sigue siendo un desafío<sup>30</sup>.

### **Rociado por Plasma (RP)**

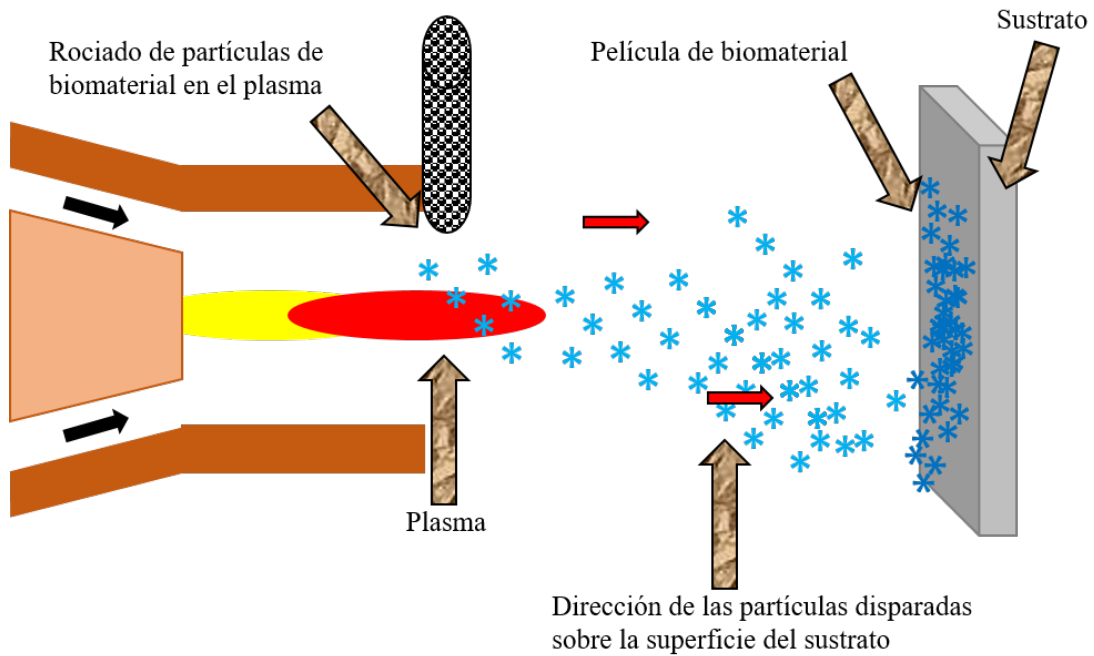
Entre los métodos existentes, el RP es uno de los que ha sido utilizado en la fabricación de implantes dentales comerciales para el recubrimiento superficial con HA<sup>31</sup>, material que debido a sus propiedades biocompatibles es el más comúnmente empleado para recubrir superficies de implantes dentales<sup>32,33</sup>.

El RP consiste en la inyección de un material (por ejemplo, HA) a través de una antorcha de plasma, a altas temperaturas y a altas velocidades sobre una superficie

(por ejemplo, titanio), donde se condensan y se fusionan entre sí, formando una película. (Figura 1) Los revestimientos pueden ser depositados con un espesor que varía desde unos pocos micrómetros a unos pocos milímetros<sup>31</sup>.

Debido a que la oseointegración nos brinda una manera de medir la biocompatibilidad y la respuesta inflamatoria de implantes intraóseos,<sup>34,35</sup> estudios *in vivo* demuestran que los implantes recubiertos con HA mediante el tratamiento de superficie de RP logran oseointegración, e incluso que la calidad y cantidad de hueso neofomado es superior a los controles sin recubrimiento de HA<sup>36-40</sup>, también se ha demostrado oseointegración temprana en comparación con implantes no recubiertos en un estudio *in vivo*<sup>41</sup>.

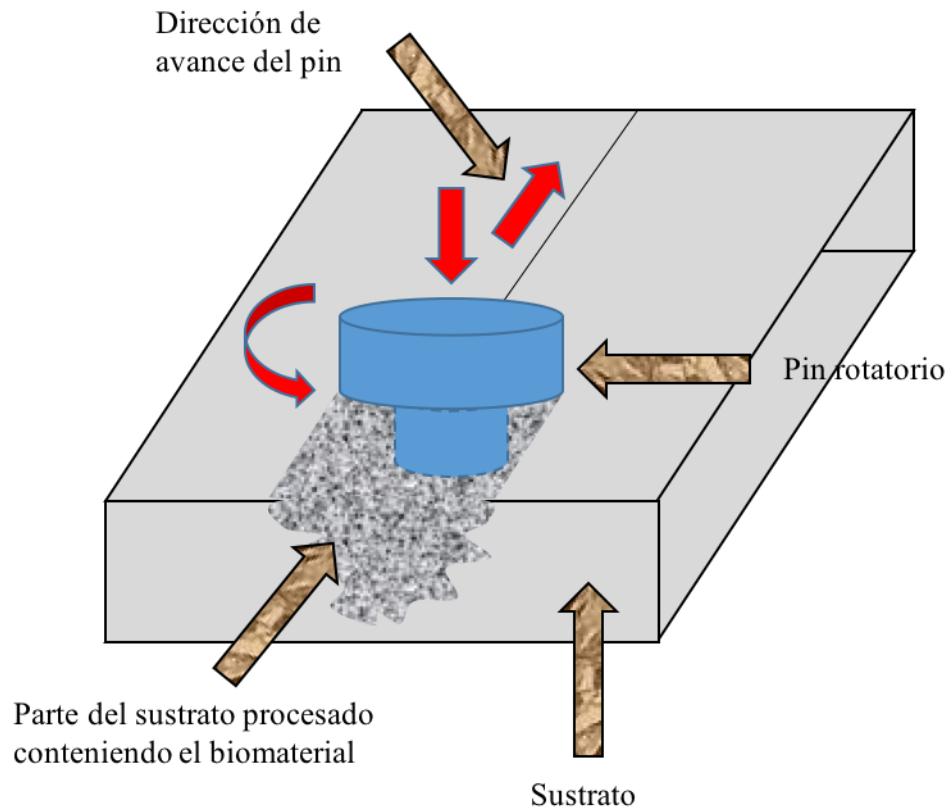
Sin embargo, los implantes dentales con recubrimiento de HA mediante el método de RP también se han asociado con problemas clínicos como la pérdida del implante. Una de las posibles explicaciones es la consecuente pérdida del recubrimiento de la superficie del implante de Ti y el fracaso en la interfase implante-recubrimiento, a pesar del hecho de que el revestimiento tiene una buena sujeción al tejido óseo. La discrepancia en la disolución entre las diversas fases que componen el revestimiento ha dado lugar a la pérdida del recubrimiento, de liberación de partículas y por tanto el fracaso clínico de los implantes. La pérdida del recubrimiento reportada en situaciones clínicas, donde la eficacia del método de RP no es óptima debido al tamaño de los implantes dentales<sup>42-44</sup>.



**Figura 1.** Procesamiento de RP. El gráfico representa la proyección de partículas hacia el sustrato dónde la antorcha de plasma que. Los asteriscos celestes simbolizan las partículas que se proyectan. (Adaptado de Mantry S, Mishra BK, Chakraborty M. Parametric appraisal of process parameters for adhesion of plasma sprayed nanostructured YSZ coatings using Taguchi experimental design. Scientific World Journal. 2013: 527491. Collection 2013.)<sup>45</sup>

### **Fricción Batida (FB)**

La FB es un método que consiste en insertar y desplazar un pin metálico no consumible que rota a una determinada velocidad sobre un material sustrato. La fricción generará una reacción térmica que logrará plastificar el material; al tener esta cualidad en el material se permite que otro material pueda agregarse, logrando así un compuesto entre el material sustrato sobre el que se trabajó la rotación del pin y otro material que se agregó luego sobre la zona plastificada<sup>46-51</sup>. (Figura 2) Recientemente Muñante<sup>52</sup> logró fabricar exitosamente nanocompuestos superficiales de nHA en sustratos de titanio, el cual es uno de los pocos estudios encontrados acerca del uso de la FB para la fabricación de compuestos de Ti y nHA.



**Figura 2.** Fricción Batida. El gráfico representa como el pin rota y avanza en un trayecto en línea recta sobre la superficie de un sustrato y genera una región plástica. (Adaptado de Mishra RS, De PS, Kumar N. Friction stir welding and processing: Science and engineering. Springer; 2014.)<sup>46</sup>

## **Antecedentes de la investigación**

Tîlmaciu y colaboradores<sup>53</sup> (2015) evaluaron *in vivo* e *in vitro* la eficacia antibacteriana y la biocompatibilidad de especímenes de titanio recubiertos con plata mediante una reacción de ácido mercaptododecilsulfónico (MDPA) seguido de una reacción con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Utilizaron 20 ratones (5 ratones por grupo). La tolerancia de especímenes de titanio recubiertos con plata se evaluó en ratones inmunocompetentes DBA después de la implantación subcutánea de discos de 10 mm de diámetro y 1 mm de espesor (se colocaron 10 discos en 5 ratones, un espécimen experimental y uno control por cada ratón) en la parte dorsal de ratones. Los ratones se sacrificaron en el día 7 y 21 después de la implantación. Los tejidos que rodean los implantes fueron fijados en solución de formaldehído al 4% durante 24 horas y procesados en histología de rutina. Secciones de 3 micras fueron desparafinadas e hidratadas antes de la tinción por solución de hematoxilina y eosina. El análisis histológico confirmó la presencia en mayoría de tejido fibroso y grasa, así como vasos sanguíneos en el día 7. En algunos lugares, se observaron signos leves de inflamación, pero no se registró alguna respuesta inmune grave, debido al rechazo del implante. Al día 21, se hicieron observaciones similares para ambos tipos de especímenes. Concluyeron que tanto los especímenes experimentales y controles fueron bien tolerados.

Lamers y colaboradores<sup>54</sup> (2012) tuvieron como propósito determinar la respuesta inmune *in vitro* e *in vivo* de especímenes de silicona con nanoranuras. En este estudio los patrones nanoestriados de las nanoranuras fueron creados mediante el uso de la litografía interferencias láser y grabado iónico reactivo. Las nanoranuras creadas imitan el entorno natural de la matriz extracelular. En el estudio *in vivo* realizado con la implantación subcutánea de los especímenes en ratones, durante 14 días se observó, mediante microscopía confocal de barrido láser, que las nanoranuras mejoraron la adhesión celular guiada, y pocas células multinucleadas se formaron. De acuerdo con los resultados del estudio *in vitro*, se encontró que la producción de citoquinas era dependiente de las nanoranuras, como la interleucina 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y la osteopontina que también fueron reguladas. Los resultados indican que la texturización de la superficie de un biomaterial, especialmente en la escala nanométrica, se puede utilizar para controlar la activación de macrófagos para inducir una respuesta de cicatrización de la herida, en lugar de una profunda respuesta inflamatoria.

Lee y colaboradores<sup>55</sup> (2007) evaluaron la biocompatibilidad de especímenes de Ti6Al4V (control) y de Ti6Al4V anodizado (experimentales). Utilizaron 48 ratones en los cuales se evaluó la reacción de los tejidos conectivos subcutáneos abdominales. Las muestras fueron implantadas en tejido subcutáneo abdominal de ratones, y se mantuvieron durante 2 y 4 semanas. Se observaron cápsulas fibrosas del tejido conjuntivo alrededor de la vecindad de las muestras, y estas cápsulas demostraron albergar fibroblastos, fibrocitos, y otras células, incluyendo los neutrófilos, macrófagos y células gigantes multinucleadas. El espesor medio de las cápsulas fibrosas observadas alrededor de los muestras experimentales era menor que la de las cápsulas vistas alrededor de muestras controles. Se obtuvo sangre de las colas de los ratones experimentales y los análisis de glóbulos se realizaron con el fin de evaluar los niveles de leucocitos, glóbulos rojos, y trombocitos. Los resultados del análisis de sangre del grupo de especímenes controles y experimentales estaban dentro de los rangos normales. Además, la biocompatibilidad de las muestras de aleación de titanio se evaluó usando técnicas de cultivo celular, encontrando un número de células MG-63 cultivadas en los especímenes experimentales mayor que en los controles; sin embargo, estos aumentos no fueron estadísticamente significativos. En conclusión, la aplicación de tratamiento de oxidación a la superficie de aleación de titanio parece afectar de manera eficaz y positivamente su biocompatibilidad.

Mohammadi y colaboradores (2004)<sup>56</sup> investigaron la respuesta ósea a largo plazo de implantes de titanio comercialmente puro maquinados sin y con revestimiento de fosfato de calcio (CaP). El tratamiento térmico se utilizó posteriormente para aumentar la cristalinidad de los recubrimientos. Cuatro tipos de revestimientos (0.1 y 2.0  $\mu\text{m}$  amorfos; 0.1 y 2.0  $\mu\text{m}$  cristalino) fueron fabricados; los implantes no recubiertos sirvieron como control. Trescientos veinte implantes (64 de cada tipo) fueron colocados en la cortical tibial y hueso trabecular femoral de 40 conejos. Los conejos se sacrificaron nueve meses después de la colocación de los implantes. La evaluación histomorfométrica reveló que los recubrimientos de CaP cristalino lograron un contacto mayor de hueso-implante en la tibia y en fémur en comparación al recubrimiento CaP amorfo y el titanio sin recubrimiento. Concluyeron que un recubrimiento ultra delgado de CaP cristalina puede obtener y mantener una mejor respuesta del hueso a largo plazo en comparación con los implantes de Ti amorfos revestidos o no, sin ningún tipo de reacciones tisulares adversas.

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV.1. Objetivo general**

Evaluar la respuesta inflamatoria y reparación del tejido conectivo frente a implantes de Ti y nHA producidos mediante FB, en ratones (*Mus musculus*).

### **IV.2. Objetivos específicos**

1. Determinar el tipo de respuesta del tejido conectivo según presencia o no de nHA en el Ti a los 14 días.
2. Determinar el tipo de respuesta del tejido conectivo según presencia o no de nHA en el Ti a los 28 días.
3. Comparar los tipos de respuesta del tejido conectivo de los implantes a los 14 días.
4. Comparar los tipos de respuesta del tejido conectivo de los implantes a los 28 días.

## **V. HIPÓTESIS**

Ha: Los implantes de Ti y nHA fabricados mediante FB (experimentales) tendrán una respuesta similar o mejor a los implantes de Ti (controles), en lomo de ratones (*Mus musculus*).

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **VI.1. Diseño de estudio**

Experimental *in vivo*.

### **VI.2. Muestra**

Se utilizaron ratones albinos (*Mus músculus*)<sup>5</sup>; que se adquirieron en el Bioterio del INS. (Anexo 1)

La muestra utilizada en esta investigación fue de 10 ratones, 05 ratones en el grupo de 14 días y 05 ratones en el grupo de 28 días de evaluación. Para la obtención del tamaño de la muestra se tomó en consideración la investigación de Tilmaciu y colaboradores<sup>56</sup>, quienes utilizaron 05 ratones por grupo de evaluación.

### **VI.3. Criterios de selección**

#### **VI.3.1. Criterio de inclusión**

- Ratones de 8 y 9 semanas de vida aproximadamente.
- Con 50 a 70 g de peso.
- Sexo hembra.
- En buenas condiciones de salud.

### **VI.3. Variables (Operacionalización de variables (Anexo 1))**

#### **Variables Independientes**

##### Implante

- Definición conceptual: Prótesis, tejido o sustancia que se coloca en el cuerpo para mejorar alguna de sus funciones, o con fines estéticos. (RAE)
- Definición operacional: Implante de Ti con o sin nHA.
- Indicador: Descripción del fabricante.
- Tipo: Cualitativa.
- Escala de medición: Nominal.
- Valores:
  - Implante de Ti y nHA mediante FB;
  - Implante de Ti sin nHA.

##### Tiempo

- Definición conceptual: Periodo determinado durante el que se realiza una acción
- Definición operacional: Desde el momento de la colocación del implante hasta el sacrificio, medido en días.
- Indicador: Días calendario.
- Tipo: Cualitativa.
- Escala de medición: Ordinal.

- Valores:
  - 14 días;
  - 28 días.

Se evaluó el tejido formado alrededor de los implantes a los 14 y 28 días; teniendo en cuenta los eventos fisiológicos del proceso de inflamación y reparación luego de la implantación de un biomaterial<sup>6</sup>.

### **Variables dependientes**

#### Inflamación

- Definición conceptual: Respuesta protectora del organismo contra la invasión de componentes extraños<sup>6</sup>.
- Dimensiones:
  - a) Inflamación Aguda<sup>5,6</sup>;
    - Definición operacional: Predominio de células polimorfonucleares.
    - Indicador: Identificación de células inflamatorias alrededor del implante.
    - Tipo: Cualitativa.
    - Escala de medición: Ordinal.
    - Valores:
      - Leve: <10 células inflamatorias por campo;
      - Moderado: 10-50 células inflamatorias por campo;

- Severo: >50 células inflamatorias por campo<sup>57</sup>.
- b) Inflamación Crónica<sup>5,6</sup>.
  - Definición operacional: Predominio de linfocitos alrededor del implante.
  - Indicador: Identificación de células inflamatorias.
  - Tipo: Cualitativa.
  - Escala de medición: Ordinal.
  - Valores:
    - Leve: <10 células inflamatorias por campo;
    - Moderado: 10-50 células inflamatorias por campo;
    - Severo: >50 células inflamatorias por campo<sup>57</sup>.

## Reparación

- Definición conceptual: Es la reorganización tisular ocurrida luego de una lesión o enfermedad por crecimiento de nuevas células sanas<sup>6</sup>.
- Definición operacional: Área de tejido en reparación circundante al implante.
- Indicador: Identificación de células, fibras y vasos sanguíneos.
- Tipo: Cualitativa.
- Escala de medición: Ordinal.
- Valores:
  - Tejido de granulación inmaduro: presencia de fibroblastos, neofomación de vasos sanguíneos;

- Tejido de granulación maduro: presencia de fibroblastos, neofomación de vasos sanguíneos, fibras colágenas;
- Inflamación granulomatosa tipo cuerpo extraño: granulomas con presencia de células gigantes multinucleadas tipo cuerpo extraño.<sup>5</sup>

#### **VI.4. Técnicas y procedimientos**

##### **Preparación de los implantes**

###### **a. Preparación del material**

El Ti para la elaboración de todos los implantes que se utilizó en el estudio fue de grado 5 (Ti6Al4V) según la clasificación de la ASTM<sup>13</sup>. Se utilizó una placa de Ti6Al4V de la casa comercial Good Fellow de 10x10x2 mm a la cual se le realizaron 3 rieles, de una profundidad de 0.2 mm y 3 mm de ancho a lo largo de la placa empleando una máquina de control numérico computarizado (VTC-16B, Yamazaki Mazak Corporation, Japón) del taller de manufactura de la Facultad de Ingeniería Mecánica de la PUCP.

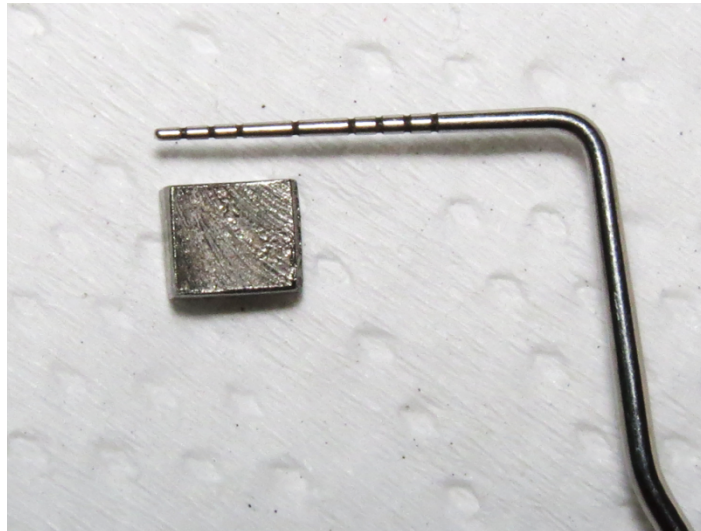
###### **b. Preparación de los implantes de Ti-nHA mediante FB**

Sobre los tres rieles preparados sobre la placa Ti6Al4V de 10x10x2 mm, se depositaron nanopartículas de HA pura (97% de pureza) de la casa comercial Sigma Aldrich (EE.UU), de un diámetro < 200 nm y un área superficial > 9.4m<sup>2</sup>/g teniendo cuidado de empaquetar el polvo de nHA de forma homogénea. La placa fue fijada en la máquina de control numérico computarizado (VTC-16B, Yamazaki Mazak

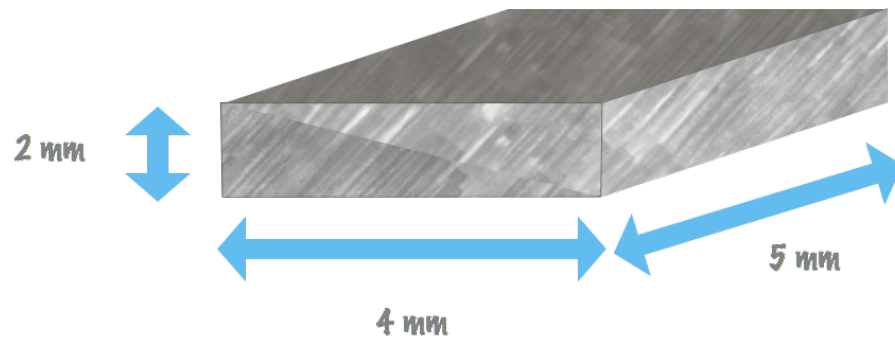
Corporation, Japón) y se utilizó como herramienta un pin de 16 mm de acero de alto carbono (Bohler K346) para el proceso de FB. Se realizaron 4 ciclos con los siguientes parámetros: 1) avance: 800 mm/min, 2) rotación: 800 rpm y 3) profundidad 0.03 mm.

Durante el proceso la temperatura se controló con un pirómetro láser para evitar alcanzar temperaturas altas, y mantener la temperatura por debajo de 850-900°C. Finalmente la placa de Ti conteniendo partículas de nHA fue lavada en ultrasonido con agua destilada por 10 min y almacenada en una manga estéril para luego ser cortada en implantes de 4x5x2 mm. (Figura 3 y 4) Los implantes controles tuvieron las mismas dimensiones que los implantes experimentales.

Los implantes fueron empaquetados de forma individual, esterilizados mediante calor húmedo a una temperatura 123°C a 133°C con una presión de 1.3 a 2.1 kgf/cm<sup>2</sup> por 16 min y almacenados para dar paso a las cirugías.



**Figura 3.** Espécimen comparado con una sonda periodontal PQW Hu-Friedy®.



**Figura 4.** Dimensiones de los implantes.

## **Consideraciones en el cuidado de los ratones**

Los ratones tuvieron un hábitat que cumplió con los parámetros establecidos por el INS<sup>58</sup>, el cual constó de un microambiente y un macroambiente. El periodo de trabajo con los ratones fue dividido en prequirúrgico, quirúrgico y postquirúrgico.

### **Microambiente**

Los ratones fueron alojados en cajas transparentes de policarbonato provistas de tapas de acero inoxidable con filtro. Las cajas tuvieron un área mínima de 480 cm<sup>2</sup>. La altura de las paredes fue  $\geq$  de 12.7 cm. Se colocaron 06 ratones por caja en la etapa prequirúrgica y posteriormente a la etapa postquirúrgica fueron separados a 1 ratón por caja; el lecho fue recubierto con viruta de madera esterilizada. Se les administró agua de mesa (Cielo ®) “ad libitum” en frascos bebederos de policarbonato y alimento balanceado para roedores que se adquirió en el Bioterio del INS.

### **Macroambiente**

Los animales fueron mantenidos en un ambiente con una temperatura de 20-25 °C y con una humedad entre 40 y 70% que fue medido con un termohidrómetro. El ambiente contó con luz artificial de lámparas fluorescentes tipo luz de día, de manera que todas las cajas, independientemente de su ubicación, recibieron intensidades similares de luz. Se programaron 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, para lo cual se utilizó un reloj temporizador. Se minimizó la generación de ruidos innecesarios. No se utilizaron productos que emanaran olores, que sean irritantes y desodorizantes en el ambiente donde estuvieron alojados los ratones<sup>58</sup>.

## **Bioseguridad**

El personal que trabajó en el bioterio tuvo una capacitación, de acuerdo con las características de las instalaciones, número de animales mantenidos y la naturaleza de la investigación que se realizó. Fue responsable de la atención y mantenimiento correcto de los animales asignados. Con relación a la bioseguridad, el personal debió identificar y evaluar los peligros y riesgos que son propios cuando se trabaja con ratones (mordidas, alérgenos y zoonosis) y de los materiales utilizados en el bioterio (agentes químicos de limpieza y sustancias biológicas peligrosas) en la intensidad de la exposición, su duración y frecuencia de uso<sup>58</sup>.

## **Eliminación de desechos**

El área de eliminación de desechos proporcionó espacio para el almacenaje apropiado de material relacionado con los animales, excrementos, camas sucias, cadáveres, materiales peligrosos, etc. Los desechos colocados fuera de las instalaciones se mantuvieron en recipientes cerrados herméticamente. Se usó bolsas rojas para el material biológico contaminado y bolsas de color negro para material sucio o desechos no contaminados<sup>58</sup>.

## **Manejo prequirúrgico**

Los ratones tuvieron un periodo de aclimatación de 02 semanas, luego de ser adquiridos, en un ambiente que cumplía con todas las recomendaciones para el manejo de ratones de experimentación<sup>58</sup>.

Los animales recibieron alimento en cantidad y calidad suficiente para sus necesidades y conservar su salud. Tuvieron acceso libre al alimento dosificado, éste se colocó en diferentes puntos para minimizar la competencia por él y asegurar que todos los ratones lo consuman. El alimento fue registrado y almacenado en contenedores. No fue expuesto a temperaturas mayores de 25 °C y humedades mayores de 60%, condiciones insalubres, luz, insectos y roedores. Los contenedores fueron lavados regularmente y permanecieron en un lugar determinado<sup>58</sup>.

La provisión de agua fue cambiada diariamente eliminando todo el contenido del frasco de bebida. Los frascos fueron lavados y desinfectados por lo menos una vez por semana. Los desechos fueron colocados fuera de las instalaciones y colocados en recipientes herméticamente cerrados. Las cajas donde estuvieron los ratones tuvieron hojas de registro acerca de los procedimientos de alimentación, grupo al que pertenecieron y los controles realizados<sup>58</sup>.

Cada ratón fue capturado, de la caja donde habitaba, por la región media de la cola con los dedos índice y pulgar. Se colocó sobre una superficie rugosa y con los dedos de la mano izquierda se le pellizó suave y firmemente en la parte posterior del cuello y los hombros para ser levantado con la mano.

La aplicación de la anestesia para la sedación fue por vía intraperitoneal utilizando clorhidrato de ketamina de 100 mg/mL y clorhidrato de xilacina de 20 mg/mL, en dosis de 50 mg/kg y 3 mg/kg respectivamente, usando jeringas de tuberculina y agujas calibre 25-27 G de ½ a 1 pulgada de bisel pequeño. La anestesia local que se le

aplicó en el lomo fue por vía subcutánea; se utilizó clorhidrato de lidocaína al 2% y agujas calibre 25-27 G de ½ a ¾ pulgada con jeringas de tuberculina<sup>58</sup>.

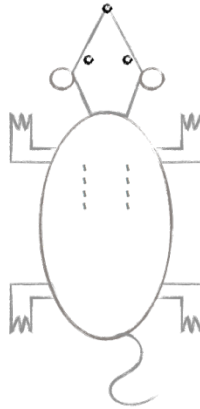
### **Manejo quirúrgico**

Una vez anestesiados los ratones en orden se procedió a rasurar la zona operatoria en el tercio anterior del lomo. Se realizó una incisión de 8 a 10 mm en sentido anteroposterior en la mitad derecha anterior y en la mitad izquierda anterior. (Figura 5) Los implantes se colocaron a nivel subcutáneo de modo que la base más ancha estuviera paralela al lomo del animal, luego se suturó el área con aguja cortante 3/8 de círculo, de 15 mm, con hilo de ácido poliglicólico de calibre 6/0 con puntos simples. En cada ratón se colocaron 2 implantes, uno experimental y uno control.

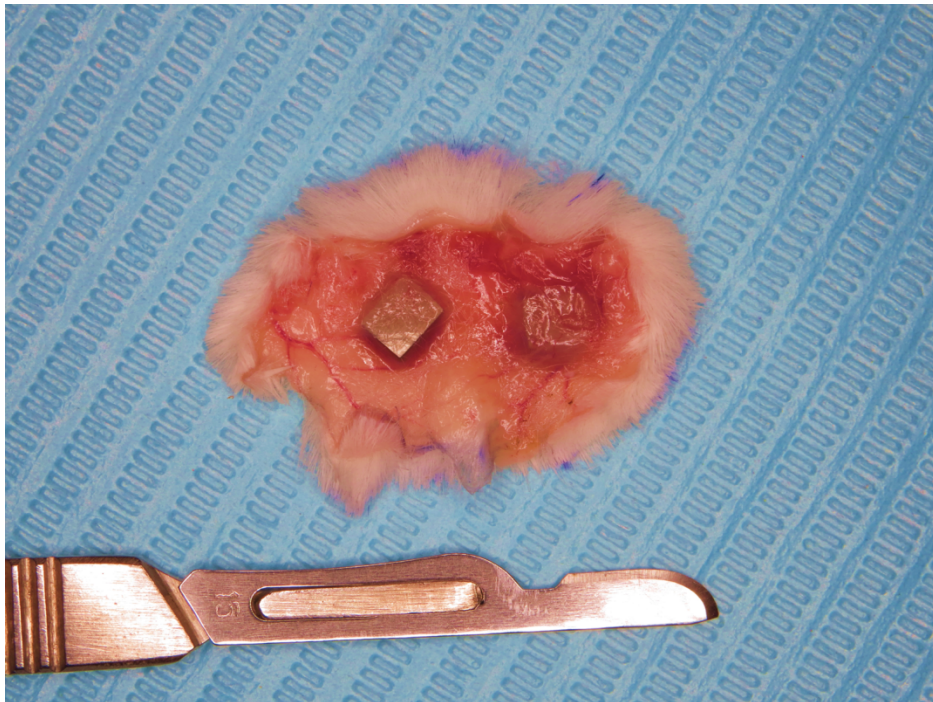
### **Manejo postquirúrgico**

Se aplicó enrofloxacina 10% inyectable y tramadol clorhidrato 50 mg/mL por vía intramuscular y se controló al ratón hasta que despertó del efecto anestésico. Cada ratón, luego del procedimiento quirúrgico, fue colocado en una caja individual. Posteriormente se mantuvieron los cuidados que se tuvieron durante el prequirúrgico.

Lomo de ratón  
Línea de incisión : - - - - -



**Figura 5.** Zona operatoria donde fueron realizadas las incisiones. Demarcadas por las 2 líneas punteadas en la zona anterior del lomo del ratón.



**Figura 6.** Tejido circundante a los implantes obtenido del lomo del ratón.

### **Sacrificio de los ratones**

En los días postquirúrgicos 14 y 28, se procedió al sacrificio de cada grupo según el orden. Se utilizó pentobarbital sódico 6.5 g/100 ml en una dosis 50-75 mg/kg hasta llegar a un plano anestésico y luego se aplicó el agente eutanásico T61® intratoraxicamente<sup>59</sup>. La eutanasia se realizó debido a que se retiró una parte considerable de piel lo cual sería incompatible con la vida. Todos los procedimientos, cuidados y el ambiente de hábitat de los ratones fueron realizados de acuerdo a la Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón; elaborado por el INS<sup>58</sup>.

### **Obtención del tejido a analizar**

Se obtuvieron las muestras con un margen de seguridad de 10 mm con el uso de bisturí. (Figura 6) El tejido fue fijado en formol al 10% por 2 días; y posteriormente se retiró cuidadosamente el implante de los tejidos. Luego fueron procesadas en el Laboratorio de Patología del Departamento de Medicina y Cirugía Bucomaxilofacial de la Facultad de Estomatología de la UPCH, en láminas histopatológicas mediante la coloración Hematoxilina-Eosina.

El patólogo del Departamento de Medicina y Cirugía Bucomaxilofacial de la Facultad de Estomatología de la UPCH responsable de la calibración y de la evaluación de las láminas histopatológicas fue el Mg. Esp. Carlos Vladimir Espinoza Montes.

### **Protocolo de evaluación de las láminas histopatológicas**

Se utilizó un microscopio de luz multicabezal, (BX50F4, Olympus Optical Co., Ltd., Japón), para realizar las observaciones, empleando lentes de 40x. La observación y conteo de células se realizó por campos. El investigador fue calibrado para la lectura de las láminas histopatológicas con un especialista del área de Patología Oral. (Anexo 3)

Se evaluó toda la superficie que estuvo en contacto con el implante, tomando en cuenta los siguientes parámetros:

- Si toda la superficie presentó características de inflamación aguda, se optó por clasificarla como inflamación aguda.
- Si gran parte de la superficie presentó características de inflamación aguda, pero en al menos un punto se presentaron células características de inflamación crónica, se clasificó como inflamación crónica.
- Si toda la superficie presenta características de inflamación crónica, se clasificó como inflamación crónica.

Se tuvo en consideración que la inflamación aguda se presentó primero que la inflamación crónica, dato que sirvió para poder diferenciar entre inflamación crónica e inflamación crónica reagudizada.

En tanto a los patrones establecidos para la observación de la reparación:

- Si se identificó fibroblastos, neoformación de vasos sanguíneos, se clasificó como tejido de granulación inmaduro.
- Si se identificaron las características anteriores más fibras colágenas, fue clasificada como tejido de granulación maduro.
- Si se identificó la formación de un granuloma más la presencia de células gigantes multinucleadas tipo cuerpo extraño fue clasificada como inflamación granulomatosa tipo cuerpo extraño.

#### **VI.5. Plan de análisis**

Los datos fueron recolectados en una hoja de cálculo de Excel® y luego procesados con el paquete estadístico SPSS 22®. Se realizó la elaboración de tablas descriptivas y tablas comparativas. Debido a que se tuvo que comparar dos grupos mediante proporciones y las muestras fueron pequeñas se aplicó la prueba de Fisher. Los datos con valor  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

#### **VI.6. Consideraciones éticas**

Aprobado por el Comité Institucional de Ética para el uso de animales - CIEA mediante el documento CONS-CIEA-010-2016; y posteriormente se presentó una enmienda que también fue aprobada. (Código de inscripción al SIDISI: 66266) (Anexo 4 y 5)

Se siguió el principio de las tres R de la experimentación humanizada para con los animales, propuesta por William Russell (zoólogo y psicólogo) y Rex Burch (microbiólogo) en 1959: Reducir, Reemplazar y Refinar<sup>60</sup>.

## VII. RESULTADOS

En la evaluación a los 14 días se encontró inflamación crónica moderada alrededor de 01 implante (en 01 implante de Ti sin nHA) (10%), Inflamación crónica severa alrededor de 03 implantes (en 01 implante de Ti sin nHA, y en 02 implantes de Ti y nHA) (30%), tejido de granulación inmaduro alrededor de 05 implantes (en 02 implantes de Ti sin nHA, y en 03 implantes Ti y nHA) (50%) y tejido de granulación maduro alrededor de 01 implante (en 01 implante de Ti sin nHA) (10%). (Tabla 1)

Al realizar la comparación entre el tipo de respuesta del tejido conectivo a los 14 días y si contenía o no nHA, no se encontró diferencia estadísticamente significativa. Prueba de Fisher ( $p > 0.05$ ). (Tabla 1)

En la evaluación a los 28 días se encontró tejido de granulación maduro alrededor de los 10 implantes (100%). (Tabla 2)

Al realizar la comparación entre el tipo de respuesta del tejido conectivo a los 28 días y si contenía o no nHA, no se calculó la prueba de Fisher porque los valores fueron constantes. (Tabla 2)

**Tabla 1.** Respuesta inflamatoria y reparación según la presencia de nHA a los 14 días.

Tipo de respuesta	n	%	Implante de Ti				p
			Sin nHA		Con nHA		
			n	%	n	%	
Inflamación crónica moderada	1	10.0	1	10.0	0	0.0	1.00
Inflamación crónica severa	3	30.0	1	10.0	2	20.0	
Tejido de granulación inmaduro	5	50.0	2	20.0	3	30.0	
Tejido de granulación maduro	1	10.0	1	10.0	0	0.0	

n: Frecuencia absoluta.

%. Frecuencia relativa.

Prueba de Fisher ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 2.** Respuesta inflamatoria y reparación según la presencia de nHA a los 28 días.

Tipo de respuesta	n	%	Implante de Ti				p
			Sin nHA		Con nHA		
			n	%	n	%	
Tejido de granulación maduro	10	100	5	50.0	5	50.0	-

n: Frecuencia absoluta.

=: Frecuencia relativa.

No se calculó la prueba de Fisher porque los valores fueron constantes.

## VIII. DISCUSIÓN

En esta investigación se encontró que no hay diferencia en el tipo de respuesta tisular al evaluar implantes con HA o sin HA a los 14 o a los 28 días. Actualmente esta investigación es una de las primeras en evaluar la respuesta biológica que se da tras la implantación de estos implantes utilizando el método de FB para la creación de compuestos de Ti y nHA, a diferencia de otras técnicas que logran la formación de una película de biomaterial sobre la superficie del sustrato que en su mayoría es titanio; la ausencia de investigaciones que tengan las mismas variables hace difícil poder comparar los resultados que se obtuvieron. Pero aun así, se podrían comparar con las investigaciones de Tilmaciu y colaboradores<sup>56</sup>, donde evaluaron la biocompatibilidad de especímenes de Ti6Al4V recubierto con una capa de plata en tejido subcutáneo de lomo de ratones a los 7 y 21 días, encontrando una respuesta similar entre los especímenes experimentales y controles; y Lee y colaboradores<sup>55</sup>, quienes evaluaron la biocompatibilidad a través de exámenes sanguíneos e histopatología de la cápsula de tejido fibroso que se formó alrededor de Ti6Al4V y otros especímenes de titanio anodizado que fue implantado en tejido subcutáneo de ratones a las 2 y 4 semanas. Estas investigaciones tuvieron una metodología similar, y resultados similares demostrando una buena respuesta por parte de los especímenes experimentales y sus controles.

Métodos nuevos de aplicación de nHA a la superficie han sido investigados *in vitro* para analizar la respuesta biológica: Liu y cols<sup>61</sup> demostraron que hay una mejora de la osteogénesis en el Ti recubierto con nHA mediante tratamiento térmico alcalino;

Zhao y cols<sup>62</sup> encontraron propiedades bioactivas y capacidad de unión ósea de Titanio con Ca-P en su superficie mediante activación ácida; Yang y cols<sup>63</sup> demostraron que se promueve la osteogénesis *in vitro*, se acorta el período de cicatrización ósea y hay una mejora en la osteointegración en implantes de Ti recubierto con Sr-HA mediante deposición electroquímica; Lu y cols<sup>64</sup> encontraron una buena biocompatibilidad en Ti recubierto con HA y Ag igualmente, mediante deposición electroquímica; y Hu y cols<sup>65</sup> demostraron biocompatibilidad y alta bioactividad de Ti recubierto con nHA mediante deposición electroquímica. Estos estudios demuestran que la nHA mejora la respuesta biológica *in vitro*, también se deberían de tener en cuenta sus propiedades al momento de interactuar con el tejido conectivo, pero el método de medición empleado en este estudio no permitió apreciar claramente el desenvolvimiento de estas características al utilizar la nHA.

El método de fricción batida logra obtener un compuesto único, que podría evitar el desprendimiento de nHA en cantidades que comprometan la estabilidad del implante una vez colocado en hueso, lo cual es una ventaja en comparación al método de rociado por plasma que deja una película de nHA en el titanio que podría desprenderse en su totalidad<sup>41-44</sup>.

En esta investigación se encontró inflamación crónica moderada y severa a los 14 días, tejido de granulación maduro e inmaduro que corresponden a los estadios de reparación. Lo encontrado nos da a entender que el proceso inflamatorio como se precisa es dinámico y pueden encontrarse inflamación crónica como evolución de la inflamación aguda, y en algunos casos tejido de granulación; a los 28 días el proceso

de reparación se encontró en todas las láminas, lo cual también reafirma que, al pasar por una etapa de inflamación, el tejido reparará.

Luego de la implantación de un biomaterial, la inflamación y la reparación se darán como proceso de cicatrización de los tejidos, estos eventos ocurrirán en simultáneo en algunas etapas<sup>66</sup>. El resultado de la interacción de los componentes de los especímenes que estén en contacto con las células, en este caso del tejido conectivo, determinará que el espécimen pueda utilizarse como un biomaterial.

La utilización de Ti6Al4V como material para la elaboración de implantes tiene resultados favorables en cuanto a su biocompatibilidad *in vivo*, como lo demostraron Kim<sup>67</sup> y Oh<sup>68</sup>. El Ti interactúa con los fibroblastos estimulando la adhesión, proliferación y aumento significativo en la deposición y maduración de colágeno, la producción de fibronectina y la activación de enzimas de remodelación en etapas tempranas<sup>69,70</sup>. Como también lo demostró Markhoff y cols<sup>71</sup> *in vitro*, quienes encontraron que Ti6Al4V provocó un aumento de la producción de MMP-1 en osteoblastos con una ligera síntesis de colágeno tipo 1 y un aumento en la síntesis de colágeno tipo 1 en fibroblastos acompañado de una mínima producción de MMP-1; estas características encontradas en conjunto confirman su participación en el proceso inflamatorio.

La HA también reporta una buena respuesta *in vitro* y biocompatibilidad frente a fibroblastos como lo demostró Comín y col<sup>72</sup>. Como se evidencia, tanto el Ti y la nHA interactúan de manera favorable con el proceso de cicatrización, y este estudio

demonstró que al ser fabricado un compuesto de estos biomateriales la respuesta del tejido conectivo visto en histopatología convencional fue similar al de los controles.

Estos sucesos ocurridos tanto en la evaluación de los grupos experimentales como los controles establecen que hay una respuesta similar en ambas situaciones. La aplicación de nHA mediante la FB no afectaría el proceso biológico, pero queda aún por investigar con exámenes más sofisticados para evaluar si elementos del implante Ti y nHA afectarán la oseointegración. Al demostrar que el implante investigado posee una respuesta similar del tejido conectivo circundante, deberían realizarse estudios de oseointegración para conocer su eficacia frente a la respuesta ósea; hasta ese momento toda evidencia científica debería ser tomada en consideración.

## **IX. CONCLUSIONES**

Los implantes de Ti con nHA obtenidos mediante FB mostraron una respuesta inflamatoria y reparación similar a los implantes de Ti sin nHA.

1. Los tipos de respuesta en el tejido conectivo alrededor de los implantes que se encontraron a los 14 días fueron inflamación crónica moderada, inflamación crónica severa, tejido de granulación inmaduro y tejido de granulación maduro.
2. El tipo de respuesta del tejido conectivo alrededor de los especímenes que se encontró a los 28 días fue tejido de granulación maduro en los implantes de Ti con nHA y sin nHA.
3. La respuesta inflamatoria y la reparación del tejido conectivo entre los grupos de implantes con nHA y sin nHA a los 14 días es similar.
4. La respuesta inflamatoria y la reparación del tejido conectivo en los grupos de implantes con nHA y sin nHA a los 28 días es similar.

## X. REFERENCIAS

1. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008; 29: 2941–53.
2. Wokalek H, Ruh H. Time Course of Wound Healing. *J Biomater Appl*. 1991; 5(4): 337–62.
3. De Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater*. 2014 Jul; 30(7): 769-84. Epub 2014 May 28.
4. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater*. 2012; 28(1): 23-40.
5. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Sci*. 2001; 31: 81–110.
6. Granjeiro JM, Soares GD. *Biomateriais em Odontologia: princípios, métodos investigativos e aplicações*. São Paulo: VM Cultural Editora Ltda; 2011.
7. Thompson JA, Anderson KD, Di Pietro JM, Zwiebel JA, Zametta M, Anderson WF, *et al*. Site-directed neovessel formation *in vivo*. *Science*. 1988; 241(4871): 1349-52.
8. Ziats NP, Miller KM, Anderson JM. *In vitro* and *in vivo* interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials*. 1988; 9(1): 5-13.
9. Anderson JM. Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices. *Cardiovasc Pathol*. 1993; 2: 33S-41S.

10. Anderson JM. Inflammatory response to implants. *ASAIO Trans.* 1988; 34(2): 101-7.
11. Chambers TJ, Spector WG. Inflammatory giant cells. *Immunobiology.* 1982; 161(3-4): 283-9.
12. Elias CN, Meirelles L. Improving osseointegration of dental implants. *Expert Rev Med Devices.* 2010; 7(2): 241-56.
13. Ribeiro da Silva J, Castellano A, Malta Barbosa JP, Gil LF, Marin C, Granato R, et al. Histomorphological and Histomorphometric Analyses of Grade IV Commercially Pure Titanium and Grade V Ti-6Al-4V Titanium Alloy Implant Substrates: An *In Vivo* Study in Dogs. *Implant Dent.* 2016; 25(5): 650-5.
14. McCracken M. Dental implant materials: commercially pure titanium and titanium alloys. *J Prosthodont.* 1999; 8(1): 40-3.
15. Zarb G, Albrektsson T. Osseointegration: a requiem for the periodontal ligament? An editorial. *Int J Periodont Rest Dentistry.* 1991; 11: 88-91.
16. Albrektsson T, Brånemark P-I, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthop Scand.* 1981; 52: 155–70.
17. Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G et al. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 88(2): 579-96.
18. Barfeie A, Wilson J, Rees J. Implant surface characteristics and their effect on osseointegration. *Br Dent J.* 2015; 218(5): E9.

19. Liao S, Li B, Ma Z, Wei H, Chan C, Ramakrishna S. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biomed Mater*. 2006 Sep; 1(3): R45-53. Epub 2006 Jul 28.
20. Kundu B, Lemos A, Soundrapandian C, Sen PS, Datta S, Ferreira JM et al. Development of porous HAp and  $\beta$ -TCP scaffolds by starch consolidation with foaming method and drug-chitosan bilayered scaffold based drug delivery system. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Nov; 21(11): 2955-69. Epub 2010 Jul 20.
21. Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *J Biomed Mater Res*. 2002 Dec 15; 62(4): 600-12.
22. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceramic Soc*. 1991; 74(7): 1487-510.
23. Kim HW, Kim HE, Salih V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin- hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2005; 26(25): 5221-30.
24. Uchida A, Shinto Y, Araki N, Ono K. Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic. *J Orthop Res*. 1992; 10(3): 440-5.
25. Walsh WR, Guzelsu N. Compressive properties of cortical bone: mineral-organic interfacial bonding. *Biomaterials*. 1994; 15(2): 137-45.
26. Kawasaki, T. Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing. *Chromatography*. 1991; 544(17): 147-84.

27. Christoffersen J, Christoffersen MR, Larsen R, Moller IJ. Regeneration by surface-coating of bone char used for defluoridation of water. *Water Res.* 1991; 25(2): 227-9.
28. Yildirim OS, Aksakal B, Celik H, Vangolu Y. An investigation of the effects of hydroxyapatite coatings on the fixation strength of cortical screws. *Medical Eng Phys.* 2005; 27(3): 221–8.
29. Zakaria SM, Sharif Zein SH, Othman MR, Yang F, Jansen JA. Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advance hard tissue engineering: A review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013 Oct; 19(5): 431-41. Epub 2013 May 14.
30. Lavenus S, Rozé J, Hoornaert A, Louarn G, Layrolle P. Impact of nanotechnology on dental implants. En: Subramani K, Ahmed W, editores. *Emerging nanotechnologies in dentistry: Processes, materials and applications.* Waltham: William Andrew; 2012. p. 71-84.
31. Le Guéhenec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007 Jul; 23(7): 844-54. Epub 2006 Aug 14.
32. Xuereb M, Camilleri J, Attard NJ. Systematic review of current dental implant coating materials and novel coating techniques. *Int J Prosthodont.* 2015; 28(1): 51-9.
33. Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: Their effect on osseointegration. A Literature Review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000; 15(5): 675-90.

34. König Júnior B, Beck TJ, Kappert HF, Kappert CC, Masuko TS. A study of different calcification areas in newly formed bone 8 weeks after insertion of dental implants in rabbit tibias. *Ann Anat* 1998; 180(5): 471-5.
35. Black J. *Biological performance of materials*. New York: Marcel Dekker; 1992. 390 p.
36. Strnad Z, Strnad J, Povýsil C, Urban K. Effect of plasma-sprayed hydroxyapatite coating on the osteoconductivity of commercially pure titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000; 15(4): 483-90.
37. Lavos-Valereto IC, Wolyneec S, Deboni MC, König B Jr. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility testing of Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating. 2001; 58(6): 727-33.
38. Ong JL, Carnes DL, Bessho K. Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants *in vivo*. *Biomaterials*. 2004; 25(19): 4601-6.
39. Vahabzadeh S, Roy M, Bandyopadhyay A, Bose S. Phase stability and biological property evaluation of plasma sprayed hydroxyapatite coatings for orthopedic and dental applications. *Acta Biomater*. 2015 Apr; 17: 47-55. Epub 2015 Jan 28.
40. Roy M, Bandyopadhyay A, Bose S. Induction plasma sprayed nano hydroxyapatite coatings on titanium for orthopaedic and dental implants *Surf Coat Technol*. 2011; 205(8-9): 2785-92.
41. Giavaresi G, Fini M, Cigada A, Chiesa R, Rondelli G, Rimondini L, et al. Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with

different surface treatments inserted in sheep cortical bone. *Biomaterials*. 2003; 24(9): 1583-94.

42. Chang YL, Lew D, Park JB, Keller JC. Biomechanical and morphometric analysis of hydroxyapatite-coated implants with varying cristallinity. *J Oral Maxillofac Surg*. 1999; 57(9): 1096-108.
43. Lee J, Rouhfar L, Beirne O. Survival of hydroxyapatite-coated implants: a meta-analytic review. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000; 58(12): 1372–9.
44. Tinsley D, Watson C, Russell J. A comparison of hydroxyapatite coated implant retained fixed and removable mandibular prostheses over 4 to 6 years. *Clin Oral Implant Res*. 2001; 12(2): 159-66.
45. Mantry S, Mishra BK, Chakraborty M. Parametric appraisal of process parameters for adhesion of plasma sprayed nanostructured YSZ coatings using Taguchi experimental design. *Scientific World Journal*. 2013: 527491. Collection 2013.
46. Mishra RS, De PS, Kumar N. Friction stir welding and processing: Science and engineering. Springer; 2014
47. Mishra R, Ma ZY, Charit I. Friction stir processing: a novel technique for fabrication of surface composite. *Mater Sci Eng A*. 2003; 341(1-2): 307-10.
48. Lee C, Huang J, Hsieh P. Mg based nano-composites fabricated by friction stir processing. *Scripta Mater*. 2006; 54(7): 1415-20.
49. Morisada Y, Fujii H, Nagaoka T, Fukusumi M. MWCNTs/AZ31 surface composites fabricated by Proceso de fricción batida. *Mater Sci Eng A*. 2006; 149(1-2): 344-8.

50. Johannes L, Yowell L, Sosa E, Arepalli S, Mishra R. Survivability of single-walled carbon nanotubes during friction stir processing. *Nanotechnology*. 2006; 17(12): 3081-4.
51. Ma ZY. Friction stir processing technology: a review. *Metall Mater Trans A*. 2008; 39(3): 642-58.
52. Muñante Palacin PE. Desarrollo de nanocompuestos superficiales de hidroxiapatita para implantes oseointegrados empleando procesos de fricción batido [tesis para optar el grado de magíster]. Lima: Escuela de posgrado, Pontificia Universidad Católica del Perú; 2013.
53. Tilmaciu CM, Mathieu M, Lavigne JP, Toupet K, Guerrero G, Ponche A et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of antibacterial activity and biocompatibility: a study on silver-containing phosphonate monolayers on titanium. *Acta Biomater*. 2015 Mar; 15: 266-77. Epub 2015 Jan 3.
54. Lamers E, Walboomers XF, Domanski M, Prodanov L, Melis J, Luttge R et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the inflammatory response to nanoscale grooved substrates. *Nanomedicine*. 2012 Apr; 8(3): 308-17. Epub 2011 Jun 24.
55. Lee YM, Lee EJ, Yee ST, Kim BI, Choe ES, Cho HW. *In vivo* and *in vitro* response to electrochemically anodized Ti-6Al-4V alloy. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 May; 19(5): 1851-9. Epub 2007 Oct 4.
56. Mohammadi S, Esposito M, Hall J, Emanuelsson L, Krozer A, Thomsen P. Long-term bone response to titanium implants coated with thin radiofrequent

magnetron-sputtered hydroxyapatite in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004; 19(4): 498-509.

57. Jurisic V, Terzic T, Colic S, Jurisic M. The concentration of TNF-alpha correlate with number of inflammatory cells and degree of vascularization in radicular cysts. *Oral Dis.* 2008 Oct; 14(7): 600-5. Epub 2008 Jan 21.
58. Fuentes FM, Mendoza RA, Rosales AL, Cisneros RA. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Instituto Nacional de Salud (Perú). Lima: Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud; 2008.
59. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Lab Anim.* 1997; 31(1): 1-32.
60. Russell WMS, Burch R. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique.* London, UK: Methuen.
61. Liu C, Dong JY, Yue LL, Liu SH, Wan Y, Liu H, Tan WY, Guo QQ, Zhang D. Rapamycin/sodium hyaluronate binding on nano-hydroxyapatite coated titanium surface improves MC3T3-E1 osteogenesis. *PLoS One.* 2017; 12(2): e0171693.
62. Zhao J, Hwang KH, Choi WS, Shin SJ, Lee JK. Biological Behavior of Osteoblast Cell and Apatite Forming Ability of the Surface Modified Ti Alloys. *J Nanosci Nanotechnol.* 2016; 16(2): 1541-4.
63. Yang HW, Lin MH, Xu YZ, Shang GW, Wang RR, Chen K. Osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells on strontium-substituted nano-

hydroxyapatite coated roughened titanium surfaces. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(1): 257-64.

- 64.** Lu X, Zhang B, Wang Y, Zhou X, Weng J, Qu S, Feng B, Watari F, Ding Y, Leng Y. Nano-Ag-loaded hydroxyapatite coatings on titanium surfaces by electrochemical deposition. *J R Soc Interface*. 2011 Apr 6; 8(57): 529-39. Epub 2010 Sep 29.
- 65.** Hu R, Lin CJ, Shi HY. A novel ordered nano hydroxyapatite coating electrochemically deposited on titanium substrate. *J Biomed Mater Res A*. 2007; 80(3): 687-92.
- 66.** Granjeiro JM, Soares GD. *Biomateriais em Odontologia: princípios, métodos investigativos e aplicações*. São Paulo: VM Cultural Editora Ltda; 2011.
- 67.** Kim H, Murakami H, Chehroudi B, Textor M, Brunette DM. Effects of surface topography on the connective tissue attachment to subcutaneous implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006; 21(3): 354-65.
- 68.** Oh S, Tobin E, Yang Y, Carnes DL Jr, Ong JL. In vivo evaluation of hydroxyapatite coatings of different crystallinities. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005; 20(5): 726-31.
- 69.** Guillem-Martí J, Delgado L, Godoy-Gallardo M, Pegueroles M, Herrero M, Gil FJ. Fibroblast adhesion and activation onto micro-machined titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Jul; 24(7): 770-80. Epub 2012 Mar 28.
- 70.** Guida L, Oliva A, Basile MA, Giordano M, Natri L, Annunziata M. Human gingival fibroblast functions are stimulated by oxidized nano-structured titanium surfaces. *J Dent*. 2013 Oct; 41(10): 900-7. Epub 2013 Jul 30.

71. Markhoff J, Krogull M, Schulze C, Rotsch C, Hunger S, Bader R. Biocompatibility and Inflammatory Potential of Titanium Alloys Cultivated with Human Osteoblasts, Fibroblasts and Macrophages. *Materials (Bgasel)*. 2017; 10(1).
72. Comín R, Cid MP, Grinschpun L, Oldani C, Salvatierra NA. Titanium-hydroxyapatite composites sintered at low temperature for tissue engineering: *in vitro* cell support and biocompatibility. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2017; 15(2): e176-e183.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1**

**CUADRO DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Indicador</b>	<b>Tipo</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Valores</b>
<b>Implante</b>	Prótesis, tejido o sustancia que se coloca en el cuerpo para mejorar alguna de sus funciones, o con fines estéticos.	Implante de Ti con o sin nHA	Descripción del fabricante	Cualitativa	Nominal	Implante de Ti y nHA mediante FB
						Implante de Ti sin nHA
<b>Tiempo</b>	Duración de las cosas sujetas a mudanza	Desde el momento de la colocación del implante hasta el sacrificio del animal, medido en días	Días calendario	Cualitativa	Ordinal	14 días
						28 días

## ANEXO 1

### CUADRO DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Dimensión	Definición operacional	Indicador	Tipo	Escala de medición	Valores
<b>Inflamación</b>	Respuesta protectora del organismo contra la invasión de componentes extraños	Inflamación Aguda	Predominio de células PMNs alrededor del espécimen	Identificación de células inflamatorias	Cualitativa	Ordinal	Leve: <10 células inflamatorias por campo
							Moderado: 10-50 células inflamatorias por campo
							Severo: >50 células inflamatorias por campo
		Inflamación Crónica	Predominio de linfocitos alrededor del espécimen	Identificación de células inflamatorias	Cualitativa	Ordinal	Leve: <10 células inflamatorias por campo
							Moderado: 10-50 células inflamatorias por campo
							Severo: >50 células inflamatorias por campo
<b>Reparación</b>	Es la reorganización tisular ocurrida luego de una lesión o enfermedad por crecimiento de nuevas células sanas		Áreas de tejido en reparación alrededor del espécimen	Identificación de células, fibras y vasos sanguíneos	Cualitativa	Ordinal	Tejido de granulación inmaduro: presencia de fibroblastos, neofomación de vasos sanguíneos
							Tejido de granulación maduro: presencia de fibroblastos, neofomación de vasos sanguíneos, fibras colágenas
							Inflamación granulomatosa tipo cuerpo extraño: presencia de granulomas con presencia de células gigantes multinucleadas tipo cuerpo extraño