UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN HISTOLOGICA DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN DE IMPLANTES ORTODONTICOS DE TITANIO. MODELO ANIMAL EN RATAS WISTAR SPF

JENNIFER GIRALDO ARCILA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSGRADO DE ORTODONCIA Y ORTOPEDIA MAXILAR
BOGOTÁ
2016

EVALUACIÓN HISTOLOGICA DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN DE IMPLANTES ORTODONTICOS DE TITANIO. MODELO ANIMAL EN RATAS WISTAR SPF

JENNIFER GIRALDO ARCILA

Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de Especialista en Ortodoncia y Ortopedia Maxilar

Director: Dr. Martín Casale Rozo
Odontólogo Pontificia Universidad Javeriana
Especialista en Ortodoncia Universidad Nacional de Colombia
Profesor Asistente Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Colombia.
Investigador Laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Javeriana.

Co-Director: Dra. Claudia Peña
Odontóloga Pontificia Universidad Javeriana
Especialista en Cirugía Oral, Maxilofacial Universidad Nacional de Colombia
Schoolar Fellowship en Cirugía Maxilofacial Pedíatrica y Malformaciones Congénitas Children's Hospital of Philadelphia. University of Pennsylvania Philadelphia P.A. U.S.A.
Magíster en Educación Universidad Pedagógica Nacional
Especialidad en Patología y Cirugía Bucal. Pontificia Universidad Javeriana

Línea de Investigación
Biomateriales (Anclaje Esquelético en Ortodoncia)

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación del Laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional.
Grupo de investigación ORTOACTIV de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia

"Y una vez que la tormenta termine, no recordaras como lo lograste, como sobreviviste. Ni siquiera estaras seguro si la tormenta ha terminado realmente; pero una cosa si es segura, cuando salgas de esa tormenta, no serás la misma persona que entró en ella. De eso se trata esa tormenta."

Haruki Murakami

Agradecimientos

A dios por estar siempre a mi lado, iluminarme durante todo este proceso de aprendizaje, y darme la paciencia, perseverancia y fortaleza para continuar hacia mis objetivos.

A mi familia por apoyarme desde la distancia en el camino hacia este sueño y acompañarme con todo su amor.

Al Dr. Martin Casale por compartir sus conocimientos, y ayudarme con la realización de esta investigación buscando siempre el mejor resultado final.

A la Dra. Claudia Peña, por dedicar gran parte de su tiempo al desarrollo de la investigación demostrando un gran interés en su avance

RESUMEN

Como respuesta a la necesidad de conseguir movimientos dentales sin transmisión de fuerzas desfavorables a la unidad de anclaje, el Ortodoncista a través del tiempo ha realizado múltiples intentos por encontrar aditamentos, que anclados al hueso, permitan lograr este objetivo.

Los Implantes Ortodónticos (IO) de Titanio han demostrado ser eficientes para el control del anclaje dental en múltiples situaciones clínicas, que son habituales para el Ortodoncista. Estudios previos realizados por el grupo de investigación, han permitido aportar información acerca del proceso de cicatrización de estos aditamentos bajo carga ortodóntica y ortopédica, evidenciando que estos aditamentos logran una fijación secundaria (oseointegración) a nivel de la cortical ósea.

Si bien se conoce el resultado final del proceso de cicatrización, no se ha descrito histológicamente en forma secuencial y detallada cómo se produce la oseointegración de los IO a nivel de la cortical ósea y qué factores podrían intervenir en este proceso. Obtener esta información es fundamental para establecer protocolos más eficientes de colocación y activación, con el propósito de hacer más predecibles estos aditamentos como Anclajes Esqueléticos en Ortodoncia.

El propósito de esta investigación es utilizar un modelo experimental animal en Ratas Wistar SPF para evaluar Histológicamente el proceso de cicatrización de Implantes Ortodónticos autoperforantes de Titanio Grado 5 (Ti6Al4Va) insertados en corticales delgadas de alta densidad ósea y determinar si la carga inmediata con fuerzas leves tiene alguna influencia en la respuesta tisular del tejido alrededor del tornillo.

Palabras claves: Implante dental, Ortodoncia, Oseointegración, mini-implantes, mini-tornillos

ABSTRACT

In response to the need to get dental movements without transfer of the anchor unit unfavorable forces, the orthodontist over time has made numerous attempts to find attachments, which anchored to the bone, would achieve this goal.

The Orthodontic Implants (IO)of Titanium have proven effective for controlling dental anchor in multiple clinical situations, which are common for the orthodontist. Previous studies by the research group, allowed to provide information about the process of healing these additions under load orthodontic and orthopedic, showing that these additions achieve a secondary fixation (osseointegration) at cortical bone.

While the final outcome of the healing process is known, it has not been histologically described in sequential detail how the osseointegration of IO is at the level of the cortical bone and what factors might be involved in this process. This information is essential to establish more efficient placement and activation protocols, in order to make more predictable these additions as partial denture anchors in Orthodontics.

The purpose of this research is to use an experimental animal model in Wistar rats SPF for histologically evaluate the healing process Orthodontic Implants autoperforantes Titanium Grade 5 (Ti6Al4Va) inserted into thin cortical bone high density and determine if immediate loading with slight forces It has any influence on the tissue response of the tissue around the screw

Key Words: Dental implant, orthodontics, Osseointegration, mini-implants, mini-screws.

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN 3
2 JUSTIFICACIÓN 4
3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 7
4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 7
5 OBJETIVOS 9
5.1 Objetivo General: 9
5.2 Objetivos Específicos: 9
6 HIPÓTESIS 10
7 ANTECEDENTES 10
8 MARCO DE REFERENCIA 13
9 DEFINICIÓN DE VARIABLES 17
9.1 Variables independientes: 17
9.1.1 Magnitud de Carga: 17
9.1.2 Tiempo de Carga: 17
9.1.3 Estabilidad Biomecánica 17
9.2 Variables dependientes: 18
9.2.1 Osteoinducción: 18
9.2.2 Oseointegración (cualitativa- dicotómica) 18
9.2.3 Fibrointegración: 19
9.3 Constantes: 20
10 DISEÑO METODOLÓGICO 20
10.1 Tipo de investigación 20
10.2 POBLACIÓN 21
10.2.1 Criterios de inclusión 22
10.2.2 Criterios de Exclusión 22
10.3 MUESTRA 22
10.3.1 PROCEDIMIENTOS REALIZADOS 24
10.3.2 HISTOTECNIA (TINCIONES) 32
10.3.3 Hematoxilina – Eosina: 32
10.3.4 Rojo Alizarín (Muestras Mineralizadas) 33

10.4 Análisis de datos: 33
11 CONSIDERACIONES ÉTICAS 34
12 RESULTADOS 37
12.1 Muestras Mineralizadas 38
12.1.1 Tinción Hematoxilina-Eosina 39
12.1.2 Tinción Rojo Alizarín 40
13 DISCUSIÓN 55
14 CONCLUSIONES 62
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 63

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1.Diseño de factores 21

Gráfica 2 Descripción de los valores de Torque de Inserción en Ncm por Grupos y día de Sacrificio. 38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estabilidad Inicial y Final. Número y Tasas porcentuales por grupos y día. 37

Tabla 2.Descripción de Depósitos de Ca sobre tejido óseo e IO según las superficies analizadas y los Días de Cicatrización 42

Tabla 3.Contacto Íntimo Hueso-Implante por grupos (Control y Experimental). Valor Promedio y Desviación Estándar 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Implantes Ortodónticos Auto-perforantes de Titanio (Ti6Al4V) con una longitud de 6 mm y un diámetro de 16 mm (Link®, MIS, Israel). 23

Figura 2. Se propone insertar tres implantes por fémur de Rata Wistar SPF 24

Figura 3. Fotografía Espécimen Implante y Hueso Mineralizado (Corte 60 micras sobre lámina porta objetos de vidrio). Tinción Rojo Alizarín. Tinción Hematoxilina-Eosina 39

Figura 4. Muestras Mineralizadas Día 2 43

Figura 5. Muestras Mineralizadas Día 4. 44

Figura 6. Muestras Mineralizadas Día 4. 45

Figura 7. Muestras Mineralizadas Día 6. 46

Figura 8. Muestras Mineralizadas Día 4 y Dia 6 47

Figura 9. Muestras Mineralizadas Día 8. 48

Figura 10. Muestras mineralizadas Dia 10 49

Figura 11. Muestras mineralizadas Dia 15. 50

Figura 12. Muestras mineralizadas Dia 20 51

Figura 13. Muestras mineralizadas Dia 25 52

Figura 14. Muestras mineralizadas Dia 30. 53

Figura 15. Muestra experimental 45 días con carga inmediata. Imágenes en microscopio Electronico de Barrido, ... 54

1 INTRODUCCIÓN

El término Oseointegración fue introducido por Branemark en la década de los sesenta (1) (2). y se puede definir como la conexión rígida, estable y clínicamente asintomática entre un material aloplástico sujeto a carga y el hueso circundante (3). La Oseointegración ha permitido el desarrollo de la Implantología como una modalidad de Rehabilitación Oral exitosa en la Odontología moderna (4).

Por su alta predictibilidad y altas tasas de éxito (90 – 98%) (5), se han realizado investigaciones encaminadas a ampliar las aplicaciones de los implantes endo-óseos en otras ramas de la odontología. En Ortodoncia, los Implantes convencionales se han presentado como alternativa en lugar de aparatos de Anclaje Extraoral ya que se comportan como anclajes absolutos que permiten movimientos dentales controlados, optimizan la mecánica ortodóntica y disminuyen tiempos de tratamiento. (6) (7) (8) (9). Aunque los reportes encontrados en la literatura son alentadores, el tamaño de los Implantes intraóseos convencionales limitan su utilización a espacios edéntulos, el paladar o la zona retromolar.

El desarrollo de implantes de menores dimensiones, denominados Mini implantes o Implantes Ortodónticos (IO), han permitido ampliar las posibilidades de utilización de estos aditamentos haciéndolos más versátiles (10). Sin embargo, aunque los IO actualmente se consideran efectivos y eficientes para Anclaje Esquelético Temporal en Ortodoncia, desafortunadamente no son predecibles y presentan gran variabilidad en su porcentaje de éxito (entre el 49% al 100%) (11) (12).

Una buena fijación mecánica inicial (Estabilidad Primaria) ha demostrado ser fundamental para el éxito de estos aditamentos, pero aparentemente no es suficiente para mantenerlos estables durante todo el tiempo de tratamiento (13). Estudios recientes utilizando IO de Titanio, han demostrado que se produce oseointegración en la interfase hueso-implante a nivel de la cortical ósea y que esta fijación secundaria, resultado del proceso de cicatrización, es la responsable de mantener la estabilidad del tornillo hasta el final del tratamiento. (14) (15) (16) (17) . Aunque se conoce el resultado (18) aún no se tiene la secuencia detallada del proceso de oseointegración de los IO a nivel de la cortical ósea. Esta información es fundamental para establecer protocolos de activación y evitar complicaciones.

Mediante un modelo experimental animal se pretende utilizar el fémur de Ratas Wistar SPF del laboratorio de Biomiméticos y reactivos biológicos del IBUN para insertar Implantes Ortodónticos autoperforantes de Titanio (Ti6Al4V) y poder evaluar Histomorfométricamente el proceso de oseointegración en corticales delgadas de alta densidad ósea y determinar si la carga inmediata con fuerzas leves tiene alguna influencia en la oseointegración.

2 JUSTIFICACIÓN

El éxito de un IO depende de la posibilidad que tiene este aditamento para mantenerse estable en el hueso, luego de la aplicación de una fuerza de tracción para realizar un movimiento dental controlado. Esta estabilidad, entendida como ausencia de movilidad y desplazamiento sin presencia de signos de inflamación en el tejido circundante, hasta hace muy poco se atribuía casi de manera exclusiva a una traba de tipo mecánico entre las roscas del implante y la cortical ósea del sitio receptor. Actualmente se reconoce que con el tiempo, cuando el implante es de una aleación de titanio, esta fijación primaria es remplazada paulatinamente por una fijación secundaria (oseointegración) resultado de un proceso dinámico de cicatrización, el cual se ve afectado por factores biológicos y mecánicos que no han sido considerados y estudiados ampliamente en los Implantes Ortodónticos.

Para determinar un protocolo adecuado de inserción y carga de Implantes Ortodónticos que asegure una mayor predictibilidad y mejore la tasa de éxito, es indispensable evaluar la interfase hueso - implante durante la cicatrización de los tejidos y la formación del nuevo hueso luego de su inserción. Esta evaluación debe incluir una serie de eventos biológicos y bioquímicos presentes en el hueso y que pueden ser resumidos en cuatro etapas: formación del coágulo de sangre, degradación del coágulo (fibrinólisis), formación de tejido granular (fibroplasia y angiogénesis) y síntesis de nuevo hueso y mineralización (modelado y remodelado óseo). Sin embargo, cuando un cuerpo extraño como un implante Ortodóntico se inserta en el hueso, su superficie interactúa con los tejidos vivos de tal manera que puede modificar la secuencia de eventos biológicos antes descrita. Por lo tanto, el éxito de la cicatrización en la interfase hueso-implante depende de dos fenómenos adicionales: osteoinducción y osteoconducción, los cuales deben ser tenidos en cuenta.

La osteoinducción es el reclutamiento de células madres que de alguna manera son estimuladas a diferenciarse como células formadoras de matriz ósea. Si estas células logran colonizar la superficie del implante entonces se dice que esta superficie es osteoinductiva. Por su parte, la osteoconducción se define como la formación de hueso sobre la superficie del implante y depende esencialmente de

la biocompatibilidad del material del implante y las características de su superficie (19). Estos dos fenómenos antes descritos pueden también verse condicionados en el caso de los IO, por el momento y la magnitud de las fuerzas de tracción ejercidas sobre el aditamento. Las cargas sobre un implante dental se traducen en estímulos eléctricos, los cuales afectan la diferenciación de las células madre en contacto con el implante, por lo que el tejido resultante en contacto con el implante podría ser hueso (cuando se diferencian de Osteoblastos), tejido blando (cuando se diferencian de fibroblastos) y/o cartílago (cuando se diferencian de condroblastos).

En un estudio In Vitro, realizado por el grupo de Investigación en colaboración con el grupo de investigación GNUM de la facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional, se llevaron a cabo ensayos de adhesión y diferenciación para evaluar la interacción de Osteoblastos con la superficie de discos de aleación de Titanio (Ti6Al4V) con diferentes tratamientos de superficie. Aunque se demostró que las superficies tratadas (Grabado ácido, Sand Blasting, y grabado ácido + Sand Blasting) presentan una mayor adhesión y diferenciación de osteoblastos, se evidenció que superficies lisas y pulidas de la aleación de Ti6Al4V son también osteoinductivas, ya que sobre éstas se observa colonización de Osteoblastos y formación de una matriz mineralizada. (19).

Teniendo en cuenta que la Aleación de Ti6Al4V es la misma utilizada para la fabricación de los Implantes Ortodónticos y reconociendo el material como Osteoinductivo, el grupo de investigación ha trabajado para conocer si los implantes Ortodónticos sufren o no un proceso de cicatrización de Oseointegración bajo diferentes magnitudes de carga, y para esto ha empleado un modelo animal estandarizado con ratas Wistar SPF del laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN), respetando todos los estándares técnicos y éticos para el manejo de animales de investigación.

Con este modelo se ha podido obtener muestras de Hueso con Implantes Ortodónticos, con las cuales se ha estudiado el comportamiento del tejido circundante al Tornillo, mediante evaluación histológica de tejido desmineralizado (20) (15) y un análisis ultraestructural en SEM por fractura de hueso e Implante incluido en resina. (16) (17). Con estos estudios se evidenció la presencia de una unión íntima entre el hueso y la aleación de Titanio (oseointegración), pero no se ha podido hacer una descripción detallada del proceso de cicatrización, así como determinar el porcentaje de Oseointegración.

Un primer intento para lograr este objetivo se realizó con la colaboración del Laboratorio de asistencia a la docencia de la Carrera de Odontología de la

Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. (18). En este estudio, se obtuvieron Cortes Mineralizados incluyendo IO de Titanio y se describió el comportamiento de los IO de Titanio durante los 8 primeros días de cicatrización.

Utilizando el mismo modelo animal, este experimento pretende profundizar en el tema describiendo el proceso de cicatrización en la interfase hueso - implante durante los primeros 30 días contados a partir de la inserción del IO; y determinar si la carga inmediata con fuerzas leves (150 gr) tiene alguna influencia en el proceso de oseointegración. Los intervalos propuestos para la evaluación son: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 25 y 30 días. Por cada día se utilizó una rata, a la cual se insertó tres (3) IO por fémur, seis (6) en total (4 experimentales con carga inmediata de 150 gr y 2 control sin carga) para un total entonces de cincuenta y cuatro (54) IO autoperforantes de Ti6Al4V. Las muestras obtenidas fueron sometidas a fijación, deshidratación e inclusión en resina, para realizar cortes de 60 micras de hueso mineralizado y metal (4 por muestra), mediante la utilización de un micrótomo Leica SP1600, el cual pertenece al Laboratorio de apoyo a la docencia de la Carrera de Odontología de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Posteriormente se realizarán procedimientos de histotecnia para poder ser analizadas bajo el microscopio de luz (Leica DM 1000 y Leica EZ4D).

La investigación es viable, práctica, verificable, útil, novedosa, beneficiosa y los resultados son importantes para la Universidad, los profesores, los estudiantes y la profesión.

Es viable ya que se cuenta con el recurso humano, los equipos, los materiales, los elementos de investigación, los protocolos, el modelo para el manejo de los roedores, los elementos de seguridad y los insumos requeridos.

La investigación es práctica porque bajo parámetros éticos se logra identificar una pregunta de investigación y responderla mediante un estudio experimental animal. Los resultados obtenidos pueden contribuir a la implementación rutinaria de anclaje esquelético con mini implantes para movimientos Ortodónticos.

Es verificable porque se realiza con la rigurosidad del método científico y todos los procedimientos a realizar se encuentran parametrizados y descritos con anterioridad.

Es útil porque permitirá aplicar los conocimientos adquiridos a la práctica clínica de la Ortodoncia, específicamente cuando es necesaria la utilización de Implantes Ortodónticos como Anclaje Absoluto para el cumplimiento de los objetivos planteados en el tratamiento.

Es novedosa porque la implementación de Anclaje Esquelético en Ortodoncia es relativamente reciente en nuestro medio y son pocos los grupos de investigación en el país que se dedican a la evaluación del sistema experimentalmente.

El trabajo se puede considerar beneficioso ya que al finalizar la investigación, conocer y divulgar los resultados aumentará la evidencia científica que justifica y promueve la utilización de Implantes Ortodónticos como Anclaje Esquelético.

El tema es importante ya que todavía es controversial considerar que un Aditamento de Anclaje Temporal Esquelético como lo es el Implante Ortodóntico se puede Oseointegrar. Es importante para la Universidad porque aporta a los estudiantes y profesores participantes una experiencia motivante de trabajo con un modelo experimental animal.

Esta investigación estará regida bajo principios éticos y de respeto por la vida, el dolor o el sufrimiento a los que los animales serán sometidos para el desarrollo del trabajo. Aunque se practicará el sacrificio de las ratas, la eutanasia se realizará evitando cualquier tipo de sufrimiento o estrés en el animal, teniendo en cuenta principios éticos y de seguridad de manera permanente. Para tal fin se utilizarán diferentes protocolos que se acompañan en este trabajo como anexos. Dichos protocolos están aprobados por la dirección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN).

3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es diferente la respuesta tisular y el proceso de cicatrización, a nivel de la cortical, en la Interfase Hueso – Implante para los Implantes Ortodónticos de Ti6Al4V insertados en el fémur de Ratas Wistar SPF cuando se aplica o no Carga Inmediata con una magnitud de 150gr?

4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El control de Anclaje es un factor fundamental para poder lograr los objetivos propuestos en un tratamiento de Ortodoncia. Los Aditamentos para Anclaje Esquelético Temporal han sido utilizados a través del tiempo como mecanismos que permiten lograr un anclaje Absoluto sin depender de la colaboración del paciente, pero hasta ahora ninguno había sido tan versátil, fácil de usar y costo efectivo como el Implante Ortodóntico. Sin embargo, los IO no son predecibles ya que tienen un porcentaje de éxito que varía entre el 49 y el 100%.

Para mejorar la eficiencia de los Implantes Ortodónticos es necesario entender el comportamiento de los tejidos en contacto con estos aditamentos, y utilizar este conocimiento para establecer protocolos de colocación y activación que mantengan su estabilidad a mediano y largo plazo. Actualmente, evidencia creciente muestra que los implantes de aleaciones de titanio pueden tener algún grado de oseointegración en la cortical ósea del sitio receptor, y que este tipo de cicatrización no constituye una complicación en el momento de retirarlos, porque el porcentaje de oseointegración es mucho menor que el que logra un implante convencional utilizado en Rehabilitación oral, por lo que al ejercer un torque reverso, el tornillo puede ser desalojado sin recurrir a procedimientos quirúrgicos complejos.

El propósito de este estudio es proporcionar evidencia que ayude a entender el proceso de cicatrización de los Implantes Ortodónticos de aleación de titanio (Ti6Al4V) a nivel de la cortical Ósea y determinar si la aplicación de una carga Ortodóntica leve (150gr) en el momento de la inserción del tornillo, puede afectar de alguna manera la estabilidad del mismo.

El grupo de investigación en Anclaje Esquelético en Ortodoncia que ha venido trabajando en el laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del IBUN, con grandes avances en la consecución de evidencia que soporta la oseointegración de estos aditamentos, pero solo hasta este momento logró acceso a la Tecnología que permite realizar cortes de Hueso mineralizado y Titanio a espesores tan delgados que permitan implementar técnicas histológicas de coloración y ser analizadas en un microscopio de luz.

Los resultados no solo serán aplicables a la práctica clínica de cirujanos y ortodoncistas que manejan los Implantes Ortodónticos, sino que servirá de base experimental para el desarrollo de un modelo matemático con el grupo de Investigación GNUM de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional, que permitirá a mediano plazo reemplazar el modelo animal y así cumplir con uno de los principios éticos fundamentales del manejo de animales experimentales (Reemplazo).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

Describir el comportamiento tisular y el proceso de cicatrización a nivel de la cortical en la interfase hueso – implante de Tornillos de Ti6Al4V insertados en el fémur de Ratas Wistar SPF sometidos a carga inmediata con una magnitud de 150 gr y sin carga a diferentes intervalos de tiempo, por un periodo de 30 días.

5.2 Objetivos Específicos:

- *Estandarizar el proceso de corte y tinción de implantes de Ti6Al4V para anclaje esquelético insertados en el fémur de Ratas Wistar SPF.*

- *Describir las características histológicas a nivel de la cortical ósea del tejido en contacto con Implantes Ortodónticos de Ti6Al4V insertados en el fémur de Ratas Wistar SPF sometidos a carga inmediata (magnitud 150 gr) y sin carga, en diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 30 días).*

- *Establecer si existen diferencias en las características histológicas del tejido en contacto para los IO insertados en el fémur de ratas Wistar SPF sometidos a carga inmediata (magnitud 150gr) y los que no fueron sometidos a carga, en los diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 30 días).*

- *Comparar el proceso de cicatrización en la zona de presión y en la zona de tensión para los IO insertados en el fémur de ratas Wistar SPF sometidos a carga inmediata (magnitud 150gr) en los diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 20 y 30 días).*

- *Cuantificar el área de contacto óseo en la interfase hueso - implante a lo largo de la cortical ósea para los IO insertados en el fémur de ratas Wistar SPF sometidos a carga inmediata y sin carga, en los diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 30 días).*

- *Comparar y determinar si existe diferencia en el área de contacto óseo en la interfase hueso – implante a lo largo de la cortical en las diferentes zonas estudiadas para los IO con carga inmediata (magnitud 150 gr) y sin Carga en los 30 días*

.

6 HIPÓTESIS

Ho = *No existe diferencia en la respuesta tisular y el proceso de cicatrización a nivel de la cortical en la Interfase Hueso – Implante para los Implantes Ortodónticos de Ti6Al4V insertados en el fémur de Ratas Wistar SPF cuando se aplica o no Carga Inmediata con una magnitud de 150 gr.*

H1 = *La respuesta tisular y el proceso de cicatrización a nivel de la cortical en la interfase Hueso – Implante para los implantes Ortodónticos de Ti6Al4V insertados en el fémur de Ratas Wistar SPF bajo carga inmediata con una magnitud de 150 gr es diferente a los que no son sometidos carga alguna.*

7 ANTECEDENTES

El Director / Investigador ha realizado en la Universidad Nacional algunas investigaciones en modelo animal utilizando ratas Wistar SPF del laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del Instituto de Biotecnología (IBUN), que han aportado alguna evidencia acerca de los tópicos en discusión.

Se realizó un estudio piloto que demostró la posibilidad de utilizar el fémur de ratas Wistar para insertar implantes Ortodónticos de Ti6Al4Va y realizar carga inmediata de 150 gr respetando los principios éticos del manejo de reactivos biológicos en investigación y donde se estableció el protocolo para el manejo de los reactivos biológicos y la colocación de los implantes Ortodónticos. (21)

En un estudio posterior, se reportó una tasa de éxito del 98% y se evaluó Histológicamente el Comportamiento Tisular a diferentes tiempos de cicatrización (0, 8, 15, 45 y 120 días) de Implantes Ortodónticos bajo carga inmediata de 150 gr. El análisis Histológico se realizó en su totalidad a muestras desmineralizadas y fueron observadas bajo microscopía óptica. Se pudo evidenciar que la carga inmediata con fuerzas ligeras no afecta negativamente el patrón de cicatrización; la disminución en el torque de inserción mediante fresado previo en corticales delgadas favorece la estabilidad primaria y no altera el patrón de cicatrización; el aumento en el torque de desinserción progresivo acorde con el tiempo de cicatrización sugiere una mayor estabilidad y posible oseointegración parcial a nivel de la cortical del Implante Ortodóntico de titanio bajo carga ortodóntica inmediata; el comportamiento tisular encontrado en cada una de las muestras determinó inflamación y reparación entre 0 y 15 días, actividad ósea en presencia de tensión a los 15 días y formación de hueso maduro a partir de los 45 días y, finalmente, las características histológicas descritas en el estudio suponen esperar

un periodo de cicatrización mayor o igual a 45 días en caso de no realizar carga inmediata en el modelo estudiado.

También se pudo determinar para la muestra estudiada, que el Grupo Control (sin carga) mostró un proceso de cicatrización similar al proceso de oseointegración de un implante convencional a nivel de la cortical. Para los 8 y 15 días se observó una zona de necrosis alrededor del IO, con presencia de infiltrado inflamatorio, osteoblastos inmaduros y abundantes fibroblastos; estas características no favorecen una carga ortodóntica u ortopédica, ya que contribuirían con la pérdida de estabilidad del tornillo. A partir de los 45 días se encontró hueso maduro alrededor del tornillo tanto para la muestra experimental (Carga Inmediata) como para el grupo control (sin carga). (15).

Recientemente se finalizaron dos investigaciones experimentales con el mismo modelo animal, una de las cuales tuvo como propósito evaluar, describir y comparar la interfase hueso – implante, la estabilidad Biomecánica y el comportamiento tisular alrededor de un IO de Titanio cuando se realiza carga ortodóntica (150 gr) y ortopédica (350 gr) a diferentes tiempos de carga (0 y 45 días) de Implantes Ortodónticos. Los resultados demostraron que la carga ortodóntica inmediata y tardía con una magnitud de 150 gr, y tardía de 350 gr en presencia de diferentes brazos de palanca (3, 5 y 7 mm) no afecta la estabilidad ni el proceso de cicatrización de Implantes Ortodónticos de Ti6Al4Va insertados en corticales delgadas de alta densidad ósea. Sin embargo, y de manera contraria, se evidenció que no es posible realizar carga inmediata con una magnitud de 350 gr aunque se haya logrado previamente estabilidad mecánica del IO porque se produce pérdida y desalojo del implante. Para el modelo estudiado, fue la magnitud de la fuerza y no el brazo de palanca el factor fundamental para la pérdida del tornillo.

Al realizar el análisis ultraestructural de la interfase hueso – implante bajo el SEM, todos los IO de Ti6Al4Va analizados mostraron oseointegración en la cortical, sin importar el grupo al que pertenecían. Después de 120 días el tornillo fue fácil de remover; el valor de los torques de remoción parecen tener relación con el grado de oseointegración del IO y podría ser un buen método mecánico para evaluar la presencia de Oseointegración. (16).

Teniendo en cuenta lo descrito y reconociendo que en el modelo animal que se viene trabajando, a los 45 días ya existe presencia de hueso maduro alrededor del Implante Ortodóntico de Ti6Al4Va, lo que podría sugerir algún grado de oseointegración del tornillo.

Posteriormente, se realizó un estudio con el propósito de evaluar, describir y comparar la interfase hueso – implante, la estabilidad Biomecánica y el comportamiento tisular alrededor de un IO de Titanio cuando se realiza carga ortodóntica (150 gr) y ortopédica (350 gr) a diferentes tiempos de carga (0 y 45 días). Se reportó que todos los Implantes Ortodónticos de la muestra presentaron Estabilidad primaria, pero para el Grupo Experimental con Carga Ortopédica Inmediata (350gr) el tornillo se perdió después de la aplicación de la fuerza. Histológicamente, para las muestras desmineralizadas no se encontraron diferencias significativas en la descripción del proceso de cicatrización de la cortical ósea alrededor de Implantes Ortodónticos después de 120 días, se evidenció neoformación ósea con presencia de Hueso maduro, compacto, bien calcificado, sin reacción tisular, rodeado de médula ósea normal, trabéculas de hueso maduro y osteoblastos maduros en toda la periferia de la Osteotomía.

El Análisis Ultraestructural de la interfase Hueso – Implante evidenció en la totalidad de las muestras analizadas al SEM (carga temprana 150 g y carga tardía de 150gr y 350gr) presencia de oseointegración tanto en la zona de Presión como en la zona de Tensión sin importar la Magnitud de la fuerza de Carga. El promedio del torque de desinserción fue mayor que el Torque de inserción para todas las muestras en los grupos evaluados, el valor del torque de desinserción fue mayor para los grupos de Carga Tardía (después de 45 días de cicatrización sin carga).

En el modelo estudiado no se pudo afirmar que los Implantes Ortodónticos se comportan como anclajes absolutos, existe una inclinación leve en dirección de la fuerza aplicada con fulcro en la cortical cuyo valor promedio, así como los valores individuales de las medidas tomadas para la muestra, no evidencian movimientos mayores a 0.2mm. (17)

En un estudio posterior, se obtuvieron Cortes Mineralizados de 90 micras incluyendo IO de Titanio que se pudieron observar al microscopio óptico. (18) La respuesta tisular y el proceso de cicatrización en la interfase Hueso – Implante para los implantes Ortodónticos de Ti6Al4V insertados en el fémur de Ratas Wistar SPF a nivel de la cortical determinó, para cada una de las muestras estudiadas, inflamación y reparación entre los 0 y 8 días.

Las superficies evaluadas en la interfase hueso-implante para el grupo Control y la superficies de Tensión (Grupo Experimental) presentaron características similares de los 0 a 8 días: Hueso viable en la periferia de la Osteotomía, Extravasación eritrocitaria que va siendo menor a medida que aumenta el tiempo de cicatrización, Presencia de osteoblastos inmaduros para el día 6 y 8 con evidencia de depósitos de calcio en la superficie del implante., Presencia de

fibroblastos y tejido fibroso; y Disminución leve de los espacios existentes en la interfase hueso-implante.

Las superficies de Presión evaluadas para el Grupo Experimental evidenciaron diferencias en el comportamiento tisular en la interfase Hueso-Implante con respecto a las otras superficies evaluadas: Disminución progresiva de la presencia de espacios en la Interfase Hueso – implante (hasta casi desaparecer para el día 8) y aumento en el porcentaje de contacto, Mayor presencia de infiltrado inflamatorio Linfocitario hacia el día 8; y Presencia de imagen en sierra en el borde de la Osteotomía con presencia de Osteoclastos.

Las muestras obtenidas en este estudio, evidenciaron la necesidad de adelgazar aún más los cortes, con el fin de hacer una mejor descripción histológica de las superficies evaluadas.

Como continuación de esta línea de investigación, y teniendo en cuenta que se pueden realizar cortes en Micrótomo de muestras mineralizadas (hueso – titanio), en este estudio se busca describir Histomorfométricamente el proceso de oseointegración de Implantes Ortodónticos autoperforantes de Titanio Grado 5 (Ti6Al4Va) insertados en corticales delgadas de alta densidad ósea, y determinar si la carga Inmediata con fuerzas leves tiene alguna influencia en la oseointegración.

8 MARCO DE REFERENCIA

La oseointegración es conocida como el proceso en el cual hay una fijación rígida clínicamente asintomática del material aloplástico y se mantiene en integración el hueso circundante a pesar de las cargas funcionales; representa una formación permanente de hueso, adaptación a la función y reparación (22).

Los minimplantes o implantes ortodónticos (IO) tienen una estabilidad primaria, que hace referencia a la estabilidad inicial inmediatamente después de su inserción y determinada por el grosor de la cortical alrededor del implante. La estabilidad secundaria se obtiene por oseointegración, representada a su vez por la condición ósea en la interfase hueso-implante (10) y su mantenimiento durante la carga ortodóntica se asocia con el incremento de la densidad ósea periimplantar y al remodelado óseo, sobre todo en zonas sujetas a fuerzas compresivas, que a su vez depende también de la magnitud durante su aplicación, la deformación ósea al recibir la carga ya la naturaleza del hueso mismo.

La literatura es escasa para referir la mayor estabilidad de los IO según el sitio de adaptación. No obstante, Zhang (10) reporta en su estudio con perros Beagle, que aunque no hay una diferencia significativa sobre el tiempo de cicatrización entre maxilar y mandíbula, hubo menor tiempo de cicatrización y mejor carga en los implantes localizados en el maxilar entre las semanas 7 y 9 después de la inserción; sin embargo, se observó mayor estabilidad inmediata a la inserción en los implantes localizados en la mandíbula. Por tanto, consideró que la estabilidad primaria está dada satisfactoriamente en los implantes localizados en la mandíbula, debido al grosor de la cortical y al grado de mineralización principalmente; mientras que la estabilidad secundaria predomina en los implantes localizados en el maxilar por la alta irrigación que favorece a su vez la osteogénesis y la oseointegración, y disposición en red del hueso trabecular. Otros autores han encontrado mayor volumen y densidad ósea en implantes ortodónticos insertados en la mandíbula después de 3 meses (23).

Otros autores (24), (22) refieren que la estabilidad de los IO se debe básicamente a factores mecánicos (tipo, diseño y disposición del implante) y biológicos (calidad y cantidad ósea). En cuanto al tipo de implante, la referencia del material de fabricación también tiene implicaciones en el proceso de oseointegración, los implantes de Titanio (14) son ampliamente utilizados gracias a la compatibilidad, resistencia a la corrosión, un amplio rango de disipar el estrés y actividad para el crecimiento de tejidos blandos y duro que caracteriza a los implantes de este material. Además, la textura del implante ha sido estudiada encontrando oseointegración tanto para las superficies lisas como rugosas o maquinadas (14); sin embargo, reporta en su estudio que los implantes ortodónticos de superficie rugosa con y sin carga, presentaron mayores signos de oseointegración en toda la superficie (control, zona de tensión y compresión), con énfasis en el tercio coronal, comparado con los implantes maquinados. En otros estudios se llevaron a cabo ensayos de adhesión y diferenciación para evaluar la interacción de Osteoblastos con la superficie de discos de aleación de Titanio (Ti6Al4V) con diferentes tratamientos de superficie. Aunque se demostró que las superficies tratadas (Grabado ácido, Sand Blasting, y grabado ácido + Sand Blasting) presentan una mayor adhesión y diferenciación de osteoblastos, se evidenció que superficies lisas y pulidas de la aleación de Ti6Al4V son también osteoinductivas, ya que sobre éstas se observa colonización de Osteoblastos y formación de una matriz mineralizada (19).

El proceso de oseointegración se puede medir a través de determinantes celulares y moleculares (25). Dentro de los parámetros radiológicos se caracteriza por

ausencia de zonas radiolúcidas entre el implante y el hueso, lo que indicaría a su vez la ausencia de tejido fibroso o conectivo en la interfase implante-hueso.

Cooper (25) muestra microfotografías de microscopio electrónico de implantes de titanio removidos después de 5 días de ser adaptados a la tibia de ratas; las imágenes muestran suficiente número de osteoblastos adheridas a fibras colágenas y matriz colágena que representa hueso inmaduro o en proceso de formación; algunas de estas células continuarán su diferenciación y la mineralización de la matriz. Actualmente se considera necesario evaluar la calidad de hueso que soporta los implantes, así como la cantidad de superficie de contacto del implante y hueso medida en porcentaje, que varía desde 50-90% para considerar un implante exitoso; sin embargo, en hueso vivo se requieren procesos de remodelación ósea que implican a su vez la presencia de cavidades de resorción. Autores han referido que basta con un 10% de contacto entre implante hueso (integración) para considerar adecuado el anclaje de un implante ortodóntico (26).

A nivel ultraestructural se observa neovascularización que precede el reclutamiento de osteoblastos para la formación de osteoides, sin condrogénesis. Algunas veces, en la interfase implante-diente se forman osteoides sin vascularización que posteriormente se mineraliza y conforman el tejido óseo rico en células y en disposición desorganizada, que luego se organiza en un sistema Haversiano como parte del proceso de oseointegración. En consideración, la actividad osteoblástica alrededor del implante puede darse por 4 factores: el reclutamiento, la diferenciación, la adhesión y la diferenciación de osteoblastos. Estos factores están a su vez altamente relacionados con el tipo de material, topografía y tipo de recubrimiento del implante. Actualmente el titanio es un material de primera elección debido al comportamiento inerte cuando entra en contacto con los tejidos biológicos. Para controlar que la topografía del implante contribuya a la adhesión y diferenciación celular, los implantes son sometidos a tratamientos que crean irregularidades superficiales; así mismo el recubrimiento basado en minerales de origen orgánico son empleados para mejorar la aposición de hueso sobre el implante (19).

Como marcador molecular, Cooper menciona que las BMP son indicadores de reclutamiento de osteoblastos debido a su acción directa con células progenitoras como proteínas osteoinductivas; estas proteínas pueden ser llevadas al medio mediante el titanio, por lo que sirve como material de revestimiento de implantes, así como la hidroxiapatita.

Otros marcadores biológicos de la oseointegración se relacionan con la adhesión del osteoblasto, como las integrinas; con la diferenciación de los mismos, como las citoquinas; y la diferenciación como fosfatasa alcalina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína ósea y osteocalcina, entre otras.

Estudios In vivo con modelo animal (24) han mostrado signos de oseointegración desde la primera semana de adaptación de los IO con y sin carga, siendo más estable (sin puntos necróticos) los IO que reciben carga mediante resortes. Otros estudios refieren que no hay diferencias significativas en la interfase hueso-implante de IO cargados de forma inmediata, tardía y sin carga (27), aunque durante la primera semana Cesare y colaboradores refiere que hay mayor contacto de superficie implante-hueso en aquellos que ha recibido carga, comparados con los IO insertados sin carga (23), lo que sugiere entonces que la estabilidad primaria de los IO permite entonces soportar la carga ortodóntica de inmediato. Sin embargo la fase comprendida entre la estabilidad primaria y secundaria conlleva un remodelado óseo que puede afectar la estabilidad del mismo implante.

Existen técnicas de laboratorio histológicas coadyuvantes para determinar marcadores de formación ósea como son las tinciones. Dentro de ellas se encuentra la tinción de hematoxilina-eosina, una coloración topográfica que permite distinguir detalles morfológicos de células y tejidos. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe de color violeta el núcleo, los ribosomas y el retículo endoplasmático rugoso, ya que tienen gran afinidad por este colorante debido a su alto contenido en ADN y ARN respectivamente. La eosina por el contrario es ácida y tiñe estructuras básicas de una tonalidad rosa, la mayoría de las proteínas citoplasmáticas son básicas, por lo tanto el citoplasma se observa de este color.

La tinción de Rojo alizarina se utiliza para determinar, cuantitativamente por colorimetría, la presencia de depósitos calcificados de células de un linaje osteogénico. Como tal, es un marcador de fase inicial de la matriz de mineralización, un paso crucial hacia la formación de la matriz extracelular calcificada. Se pueden observar los cristales de hidroxiapatita y fosfato de calcio mediante esta tinción al adherirse al calcio y otros cationes, por tanto es una de las tinciones más comunes en investigaciones con material óseo (19) (28).

9 DEFINICIÓN DE VARIABLES

9.1 Variables independientes:

9.1.1 Magnitud de Carga:

Se define como la fuerza aplicada al Implante Ortodóntico mediante el uso de un resorte de Nitinol y medida en gramos con un dinamómetro. Se registra de acuerdo al valor de la Fuerza aplicada:

- 0 Gramos
- 150 Gramos

9.1.2 Tiempo de Carga:

Se define como la cantidad de días en los cuales el Implante Ortodóntico estuvo insertado en el hueso. Se registra de acuerdo al número de días:

- 0 días
- 2 días
- 4 días
- 6 días
- 8 días
- 10 días
- 15 días
- 20 días
- 30 días

9.1.3 Estabilidad Biomecánica

9.1.3.1 Estabilidad Primaria

Evaluada al momento de insertar el implante en el hueso.

Se registrará como:
***SÍ*:** si hay movilidad
***NO*:** no hay movilidad.

9.1.3.2 Estabilidad Final

Evaluada al finalizar el experimento, en el momento del sacrificio del animal. Se registrará como:

***SÍ*:** si hay movilidad
***NO*:** no hay movilidad.

9.2 Variables dependientes:

9.2.1 Osteoinducción:

Se define como el reclutamiento de células madre sobre la superficie del implante, que de alguna manera son estimuladas a diferenciarse como células formadoras de matriz ósea (Osteoblastos). Se evaluará mediante microscopía óptica (Microscopio Leica DM 1000 y Leica EZ4D) luego de realizar los cortes a 60 micras de muestras mineralizadas en micrótomo para tejidos duros Leica Saw SP1600. Los cortes serán re-hidratados y posteriormente teñidos con Rojo Alizarín (tinción que se usará para determinar el depósito de calcio alrededor de los implantes).

Se valorará de la siguiente manera:
***Si*:** Hay mineralización de la matriz en contacto con los IO
***No*:** No hay mineralización de la matriz

9.2.2 Oseointegración (cualitativa- dicotómica)

Se define como la conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo y la superficie de un implante, lo que es esencialmente una anquilosis de la interfase hueso-implante. Se evaluará mediante microscopía óptica (Microscopio Leica DM 1000 y Leica EZ4D) luego de realizar los cortes a 60 micras de muestras mineralizadas en micrótomo para tejidos duros Leica Saw SP1600. Los cortes serán re-hidratados y posteriormente teñidos con Hematoxilina/Eosina (tinción que se usará para el análisis de rutina y evaluar la morfología tisular y celular) y con Rojo Alizarín (tinción que se usará para determinar el depósito de calcio alrededor de los implantes).

Se registrará de acuerdo a la dirección de la fuerza:
Presión: zona de la interfase hueso implante en la cortical ósea del fémur, ubicada en la dirección de la fuerza (entre implante e implante cargado).
Tensión: zona opuesta a la fuerza ejercida (entre parte proximal del fémur y el implante, o parte distal del fémur y el implante).

Nota: Para el caso de los implantes sin carga, donde no existe zona de presión y tensión se evaluará la zona distal o proximal al fémur.
Se valorará de la siguiente manera:
***Si*:** Hay oseointegración
***No*:** No hay Oseointegración mediante estudio histológico en cada uno de los lados (presión, tensión).

9.2.2.1 Porcentaje de Oseointegración:

Luego de obtener la imagen digital de la interfase hueso-implante a lo largo de la cortical con el microscopio Leica DM 1000 y utilizando un analizador de imagen digital (Imagen J™), se tomará la medida en mm del área Total del tornillo insertado en la cortical y las medidas en mm de las áreas de contacto íntimo entre el hueso y el implante. Posteriormente, se realizará la operación matemática para obtener un porcentaje:

$$\% \text{ Oseointegración} = \frac{\text{Áreas de Contacto (mm) x 100}}{\text{Área de máximo contacto en la Cortical (mm)}}$$

9.2.3 Fibrointegración:

Se define como la conexión directa entre el tejido fibroso y la superficie de un implante. Se evaluará mediante microscopía óptica (Microscopio Leica DM 1000 y Leica EZ4D) luego de realizar los cortes y adelgazarlas a 60 micras de muestras mineralizadas en micrótomo Leica Saw SP1600. Los cortes serán re-hidratados y posteriormente teñidos con Hematoxilina/Eosina y Rojo Alizarina.

Se registrará de acuerdo a la dirección de la fuerza:

Presión: zona de la interfase hueso implante en la cortical ósea del fémur, ubicada en la dirección de la fuerza (entre implante e implante cargado).

Tensión: zona opuesta a la fuerza ejercida (entre parte proximal del fémur y el implante, o parte distal del fémur y el implante).

Nota: Para el caso de los implantes sin carga, en donde no existe zona de presión y tensión se evaluará la zona distal o proximal al fémur.

Se valorará de la siguiente manera:
***Si*:** Hay Fibrointegración

***No*:** No hay Fibrointegración

9.2.3.1 Porcentaje de Fibrointegración:

Luego de obtener la imagen digital de la **interfase hueso-implante a lo largo de** la cortical con el microscopio Leica DM 1000 y utilizando un analizador de imagen (Imagen J™), se tomará la medida en mm del área del tornillo insertado en la cortical y las medidas en mm de las áreas de contacto íntimo entre el tejido fibroso y el implante. Posteriormente, se realizará la operación matemática para obtener un porcentaje:

$$\% \text{ Fibrointegración} = \frac{\text{Áreas de Contacto (mm) x 100}}{\text{Área de máximo contacto en la Cortical (mm)}}$$

9.3 Constantes:

- Diseño del IO : Longitud (06 mm), diámetro (1.6 mm).
- Momento de carga : Inmediata (día 0).
- Modo de inserción : Autoperforante con control de Torque de Inserción (Fresado previo al grosor de la Cortical)
- Superficie del implante: Liso y pulido.
- Densidad ósea : Densidad tipo 1.
- Grosor de la cortical : 1.2 mm (promedio).
- Torque de Inserción : 5 Ncm

10 DISEÑO METODOLÓGICO

10.1 Tipo de investigación

El estudio es Experimental en Modelo Animal.

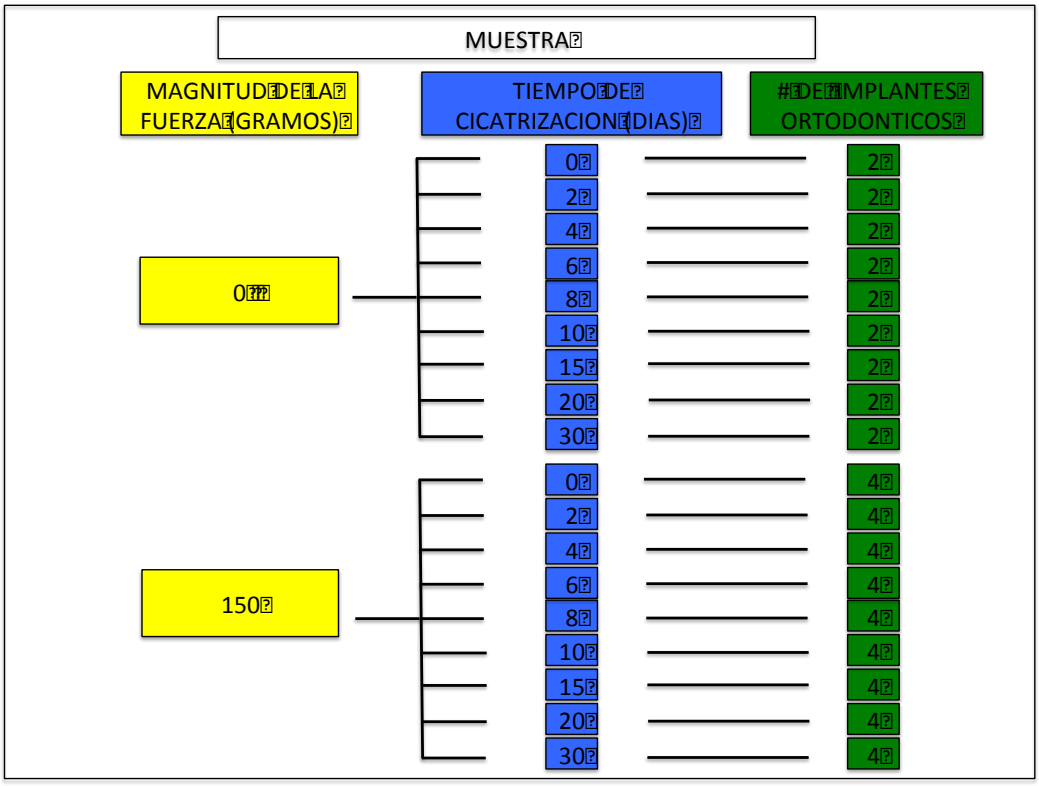
En este estudio se implementó un diseño experimental de dos factores: Magnitud de la Carga aplicada al Implante Ortodóntico y Tiempo de Cicatrización.

El primer factor: “Magnitud de Carga Aplicada al Implante Ortodóntico” presenta dos niveles: 0 y 150 gr.

El segundo factor: “Tiempo de Cicatrización” presenta nueve niveles: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 30 días.

Finalmente se obtuvieron dieciocho (18) interacciones o tratamientos con cuatro (4) repeticiones (Implantes Ortodónticos) para el grupo al que se le aplica 150gr, y dos (2) repeticiones (Implantes Ortodónticos) al que no se le aplica carga (0 Gr). (Grafica 1).

Posteriormente las muestras obtenidas de los 54 minimplantes, se desgastaran en un dispositivo para refinamiento de muestras mineralizadas buscando hasta obtener un grosor de cada muestra de 60 micras. Las láminas con los cortes correspondientes a cada muestra se analizaron en microscopia óptica a 4x, 10x, 20x y 40x evaluando con la Dra. Claudia Peña, si existe un íntimo contacto entre el IO y el hueso, la presencia de células, y si hay una relación entre la fuerza y la cantidad de oseointegración dependiente de la dirección de la misma



Gráfica 1.Diseño de factores

10.2 POBLACIÓN

La unidad de Análisis corresponde a Ratas Wistar SPF del Laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), mantenidas con un ciclo artificial de 12

horas luz/oscuridad, control de iluminación, temperatura, humedad y ventilación y con una dieta de píldoras estándar y agua ad libitum.

La Unidad de muestreo corresponde a Implantes Ortodónticos Autoperforantes de titanio grado 5 (Ti6Al4Va) de la casa comercial MIS (Link®) de 1.6 mm de diámetro 6 mm de longitud insertados en el fémur de Ratas Wistar SPF.

10.2.1 Criterios de inclusión

La muestra para el estudio debe cumplir los siguientes requisitos:

Implantes

- Implantes Ortodónticos Autoperforantes de Titanio grado 5 (Ti6Al4Va) de la casa comercial MIS (Link®) de 1.6 mm de diámetro y 6 mm de longitud Nuevos, con doble empaque sellado herméticamente y esterilizados.

Animales

- Ratas Wistar SPF Macho sistémicamente sanas de tres meses de edad (peso superior a 350 gr) de la sala SPF del Laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del IBUN.
- Fémur de Ratas Wistar sin signos radiográficos o clínicos de fractura.

10.2.2 Criterios de Exclusión

Implantes

- Pérdida del selle hermético del segundo empaque del IO que evidencia pérdida de la esterilización o manipulación previa del tornillo.
- Evidencia macroscópica de algún defecto de fabricación.

Animales

- Signos de fractura o algún tipo de lesión en el fémur, diagnosticada radiográfica o clínicamente previa a la inserción del IO.

10.3 MUESTRA

Cincuenta y cuatro (54) Implantes Ortodónticos (IO) Cilíndricos Autoperforantes Link® **(**MIS® Implants Technologies LTD, Israel) de aleación de Titanio (Ti 6Al 4V), con un diámetro de 1.6mm y longitud de 6mm *(Figura 1)*, fueron colocados en

grupos de tres (3) en el fémur derecho e izquierdo de Ratas Wistar SPF (nueve ratas en total).

En cada fémur, dos de los IO se insertaron paralelos uno con respecto al otro y fueron sometidos a Fuerza de Tracción con una magnitud de 150 gramos inmediatamente después de su inserción (Carga inmediata), utilizando módulos de resorte NiTi (ORMCO®) y calibrando la fuerza con un dinamómetro (Dontrix®). Al tercer IO no se le aplico ninguna carga (0 gr) y fue ubicado en el espacio comprendido entre los dos anteriores, con una dirección de inserción de 45º con respecto al eje de los implantes experimentales, evitando cualquier contacto con el resorte de activación. Los implantes con carga inmediata de 150gr fueron considerados Grupo Experimental y los implantes sin carga, Grupo Control. (*Figura 2*).

Figura 1. Implantes Ortodónticos Auto-perforantes de Titanio (Ti6Al4V) con una longitud de 6 mm y un diámetro de 16 mm (Link®, MIS, Israel).

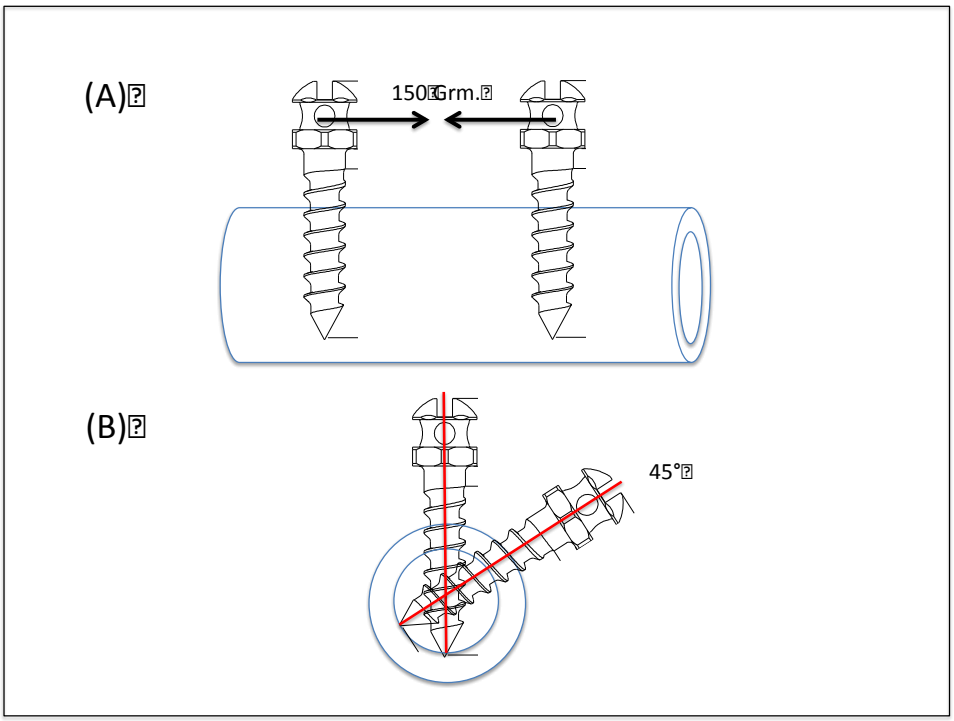


Figura 2. Se propone insertar tres implantes por fémur de Rata Wistar SPF de la siguiente forma: (A) Dos Implantes Ortodónticos Insertados paralelos uno del otro y cargados entre sí de forma inmediata con una fuerza de tracción de 150gr (Grupo Experimental). **(B)** Implante Ortodóntico sin carga (Grupo Control) insertado en el espacio comprendido entre los dos IO experimentales y con una angulación de inserción de 45° con respecto al eje de los dos anteriores para evitar contacto con el resorte de activación**.**

10.3.1 PROCEDIMIENTOS REALIZADOS

Los procedimientos quirúrgicos para la inserción de los Implantes Ortodónticos en el Fémur, así como el sacrificio de los animales para la obtención de la muestra; fueron realizados como parte de un estudio previo de la línea de investigación, con la participación de la Dra. Tihany Rodríguez y titulado: "Evaluación Histomorfométrica del proceso de cicatrización de Implantes Ortodónticos de titanio", presentado en el 2012 como Tesis de Grado para obtener el título de Especialista en Ortodoncia en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia (Acta de aprobación comité de ética No.0-07) Aunque para esa investigación se realizaron todos los procedimientos experimentales, los cortes histológicos solo se pudieron realizar en forma parcial y únicamente para muestras de 0, 2, 4, 6 y 8 días. Las muestras correspondientes a los días, 10, 15, 20 y 30 días, así como las muestras correspondientes a los días 0, 2, 4, 6, y 8 se mantuvieron bajo custodia de la Dra. Constanza Martínez Cardozo en el laboratorio de asistencia a la docencia de la Carrera de Odontología en la Pontificia Universidad Católica de Chile. Posteriormente estas muestras fueron

adelgazadas en un micrótomo Leica DM 1000 hasta 60 micras, se observaron por microscopia óptica en la Universidad Nacional y fueron leídas con la Dra. Claudia Peña docente de cirugía maxilofacial, especialista en patología oral

A continuación, se hace descripción de los procedimientos realizados:

Abordaje Quirúrgico:

El proceso se inició realizando lavado de manos con jabón quirúrgico siguiendo el protocolo de lavado y secado para entrar a la sala de animales del Bioterio del IBUN. Posteriormente se entró al cuarto para cambio de ropa de calle por ropa quirúrgica esterilizada y por turnos se ingresó al área blanca.

Se seleccionó la rata Wistar de la sala de animales, para realizar los procedimientos experimentales (rata macho, mayor a tres meses de nacida, con un peso superior a 350 gr) y se inició el seguimiento estricto del protocolo para el suministro de la anestesia:

Protocolo para el suministro de anestesia y analgesia en los animales alojados en la sala SPF, del Laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del IBUN.

Inducción y mantenimiento anestésico

1. *Limpiar el mesón de procedimientos del área de acondicionamiento con Tego al 2%. En esta se desarrollará el procedimiento quirúrgico.*
2. *Colocar en el vaporizador anestésico en el mesón, éste cuenta con un contenedor en el cual se vierte el Isofluorano.*
3. *Para servir el Isofluorano, primero verificar fecha de vencimiento del medicamente y luego verificar que el día del control esté en posición de apagado, abrir el contenedor y llenar. El nivel del líquido se puede visualizar y no se debe servir menos del nivel marcado en el contenedor.*
4. *Dejar estabilizar el equipo durante diez minutos antes de conectarlo al animal.*
5. *Conectar la manguera que va del oxígeno al vaporizador, la conexión se encuentra en la parte posterior del vaporizador. Abrir la llave del oxígeno y dejar un flujo de oxígeno a 4 litros por minuto como mínimo por dos minutos para que el gas pase por el vaporizador, previniendo así una incorrecta dosificación del gas anestésico.*
6. *Alistar la cámara de inducción anestésica; ésta tiene dos conectores uno ubicado en la parte superior de la cámara y en el otro extremo parte inferior se encuentra el otro. En la parte inferior conectar la manguera que viene del*

vaporizador y en la parte superior conectar la manguera que va al frasco de desechos del Isofluorano.

7. *Una vez adecuada la caja colocar dentro de ella el animal y cerrar deslizando la tapa superior.*
8. *Girar el dial del vaporizador de 4 a 5% y el flujo de oxígeno de 0.5 -1.0 litros por minuto. El tiempo de inducción anestésica varía de 5 a 10 minutos. Cuando el animal pierda la conciencia sacarlo de la cámara y ubicarlo sobre un campo quirúrgico estéril y ponerle la mascarilla anestésica. Este procedimiento se debe realizar de manera rápida evitado así que el animal despierte.*
9. *La mascarilla anestésica tiene dos entradas, en la derecha conecta la manguera que viene del vaporizador y en la izquierda conecta la manguera que va al frasco de desechos.*
10. *Para el mantenimiento anestésico regule el dial del vaporizador de 1-3% con oxígeno al 100% y flujo de oxígeno de 0.5-1 litro por minuto.*
11. *Determinar la profundidad anestésica teniendo en cuenta los siguientes parámetros:*

- *Perdida de reflejos: Cutáneo, Patelar, Corneal, Recuperación de postura.*
- *Ausencia de movimientos de mandíbula, orejas y vibrisas frente a estímulo táctil.*
- *Midriasis.*
- *Relajación muscular: ausencia de movimientos musculares voluntarios, pérdida de la vocalización.*

Antes y durante la cirugía se vigilarán los signos vitales y se anotarán estos datos en la historia clínica:

- *Temperatura Corporal: que deberá estar entre 35.9 a 37.5%*
- *Frecuencia cardíaca: con un rango de 250 a 450 latidos por minuto*
- *Frecuencia respiratoria: que deberá 70 a 115 respiraciones por minuto.*

También se anotó en la historia clínica la administración de medicamentos y sus dosis durante el procedimiento.

Se realizó un lavado de la superficie medial de la zona del fémur con alcohol antiséptico al 70%. Se depiló con ayuda de una rasuradora eléctrica la zona a intervenir sobre papel de esterilizar y se eliminaron posteriormente los desechos.

El animal se fijó a la mesa utilizando cinta de enmascarar sobre un campo quirúrgico estéril y los miembros superiores e inferiores permanecieron extendidos durante todo el procedimiento.

Con un mango para bisturí y hoja No.15, se realizó una incisión en piel de 15 – 20mm de longitud, paralela al eje longitudinal del fémur en la superficie medial. Utilizando una tijera de tejidos se disecó la piel, exponiendo el músculo de la zona, y se mantuvo separada por medio de dos (2) ganchos de piel proporcionando un área adecuada para la incisión del músculo hasta exponer la superficie medial del fémur. De nuevo se reubicaron los ganchos quirúrgicos para mantener el hueso expuesto.

Para la colocación de los Implantes Ortodónticos se evaluó la superficie del fémur y se escogió una superficie adecuada para la inserción en la zona proximal y otra en la zona distal del fémur. Mediante el uso de un motor de implantes calibrado a 1200 rpm e irrigando profusamente con suero fisiológico, se realizó un fresado sólo al grosor de la cortical con una broca cilíndrica de acero de 1.3 mm de diámetro. Aunque se utilizó un tornillo autoperforante (Link®), la decisión de realizar un fresado previo surgió por la necesidad de estandarizar el torque de inserción en 5 Ncm y disminuir la presión sobre la cortical del fémur evitando posibles fracturas de las crestas inter-roscas de la cortical.

El IO viene en un vial esterilizado de doble bolsa, que se debe romper para que con la punta del sistema adaptada al contra ángulo del motor de implantes se pueda fijar la cabeza del mismo con el fin de manipularlo adecuadamente. El IO se ubicó en el orificio realizado con la broca y mediante una fuerza de inserción manual suave se insertó en el hueso. El torque de inserción se medirá mediante el motor de implantes calibrado a 5Ncm y con 30 rpm.

Luego de Insertar el IO en el fémur, se evaluó la fijación primaria (el implante debe ser capaz, al ser sujetado con una pinza Mathews, de mover la extremidad de la rata sin presentar ningún grado de movilidad). Este mismo procedimiento se realizó para la colocación del segundo IO en el mismo fémur, el cual se insertó paralelo al anterior.

El tercer IO se colocó en el espacio comprendido entre los dos implantes anteriores con un ángulo de inserción de 45° (teniendo como referencia el eje de los Implantes Ortodónticos). Excepto el ángulo de inserción, se repitió todo el procedimiento de inserción de los dos implantes anteriores.

Para los dos IO Experimentales que fueron cargados inmediatamente se utilizó un módulo de resorte de Nitinol de Ormco® de 9mm, calibrado para ejercer la fuerza ortodóntica propuesta de 150gr, dicha fuerza se verificó mediante el uso de un Dontrix®. Para el tercer implante (grupo control) al que no se aplicó carga ortodóntica, no se realizó el paso anterior. Después de efectuados estos

procedimientos se suturó por capas el tejido muscular y cutáneo con Vicryl 4-0 reabsorbible.

El tejido cutáneo se suturó de forma intradérmica para evitar que la rata pudiera romper la sutura y se abriera la herida. Finalizado el procedimiento quirúrgico, se administró el antibiótico sugerido por el protocolo del IBUN (Penicilina sódica intramuscular).

Protocolo para el suministro de anestesia y analgesia en los animales alojados en la sala SPF, del Laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del IBUN.

Analgesia después de Procedimiento Quirúrgico

- *La analgesia se debe suministrar 15 a 20 minutos antes de que finalice el procedimiento quirúrgico.*
- *En el pos operatorio revisar dos veces al día a el animal observar y registrar si hay síntomas y signos de dolor con ayuda de la guía diseñada para este fin que se encuentra en la historia clínica del animal.*
- *El analgésico sugerido es Meloxicam 1ml de producto contiene 5mg de Meloxicam.*
- *Calcular dosis a suministrar del medicamento según el peso del animal: 0.2 mg/kg de peso.*
- *Administre por vía subcutánea durante tres días o hasta que el animal lo requiera.*

El animal intervenido se colocó dentro de una caja con rejilla ubicada en la sala de animales, donde permaneció sobre una colcha térmica durante los tres días siguientes o según estado del animal (máximo una semana). Durante la fase de recuperación (3 primeras semanas máximo) las ratas permanecieron en un área de recuperación post quirúrgica, preferiblemente en caja individual para evitar que entre ellas se retiraran las suturas.

Los animales fueron supervisados diariamente, los cambios de cama se realizaron una (1) vez por semana, los de comida y agua diariamente, ya que fueron mantenidos durante todo el experimento con una dieta de píldoras estándar y agua ad libitum.

Aleatoriamente se filmó la recuperación de los animales en la sala para confirmar que tuvieran una movilidad adecuada, que se pudieran sostener sobre sus patas traseras para alimentarse y no presentaran signos de dolor o estrés.

Sacrificio de animales:

Cumplidos los días de cicatrización propuestos después de la colocación de los Implantes Ortodónticos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 y 30 días), se procedió al sacrificio de los animales, siguiendo el cronograma propuesto para tal fin. La Eutanasia de la rata se realizó mediante cámara de CO2, evitando cualquier tipo de sufrimiento o estrés en el animal, teniendo en cuenta siempre los principios éticos y de seguridad. El procedimiento lo realizó el mismo equipo de operadores que participó en las cirugías de la investigación y en las mismas instalaciones del IBUN siguiendo el protocolo para eutanasia de ratas Wistar del Laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del IBUN.

<u>Protocolo en la práctica de eutanasia en los animales de experimentación alojados en la sala SPF. Bioterio de IBUN</u>

1. Alistar los elementos a utilizar.
2. Identificar el animal al cual se le practicará la eutanasia, revisando el cronograma de Procedimientos Quirúrgicos y verificando el número marcado en la cola de la rata.
3. De manera tranquila retirar el animal de su jaula de origen y llevarlo al área de acondicionamiento del laboratorio.
4. Alistar la cámara de acrílico para inducción anestésica, la cual será la misma para realizar la Eutanasia mediante la utilización de C02. Esta tiene dos conectores, uno ubicado en la parte superior y otro en la parte inferior, en extremos opuestos. El conector de la parte inferior se debe fijar a la manguera que viene del tanque de CO2 y el conector ubicado en la parte superior se debe sellar herméticamente.
5. Antes de abrir la llave del CO2, se debe colocar el animal dentro y cerrar la tapa deslizándola hasta lograr un cierre hermético. La Eutanasia tiene una duración de dos (2) minutos, tiempo suficiente para el sacrificio del animal de una forma tranquila y sin sufrimiento.
6. Se desconecta la manguera de CO2 y se hace examen visual de la rata, para constatar que la rata no presenta ningún movimiento. Se lleva la Caja a la mesa de procedimientos, en donde antes de disponer del cadáver se debe verificar la muerte.

La rata sacrificada será colocada sobre papel de esterilizar en donde se mantendrá el cuerpo y los desechos para posteriormente ser eliminados según protocolo del IBUN.

Procedimiento de toma de muestra:

Se realizó lavado de manos con jabón quirúrgico, se ingresó al cuarto para cambio de ropa de calle por ropa quirúrgica y posteriormente se entró al área blanca siguiendo los pasos descritos en el protocolo del IBUN. Se seleccionó la rata Wistar a la que se realizaría la eutanasia, identificándola según marca registrada en la historia clínica, que debía coincidir con el número marcado en la cola del animal, y acorde con el cronograma de sacrificios. Se aplicó el protocolo escogido para tal fin, según recomendación de la dirección del IBUN.

La rata fue rasurada con ayuda de una rasuradora eléctrica. Este procedimiento cubrió toda la zona dorsal del animal y la zona medial de las extremidades inferiores. Una vez depilada el área a intervenir, el animal se fijó sobre un campo quirúrgico a través de los miembros inferiores, los cuales permanecieron extendidos por medio de cinta de enmascarar durante todo el procedimiento y una tachuela que fijó los pies a un corcho sobre el cual se extendió el papel de esterilizar.

Seguido a esto se realizó una incisión en piel que se extenderá del miembro inferior derecho al miembro inferior izquierdo en su porción medial. Sobre la superficie dorsal del animal se realizó otra incisión que inició en la incisión anteriormente descrita y se extendió hasta la base de la cola del animal. Utilizando una tijera de tejidos se disecó la piel, exponiendo el músculo de la zona, desplegando dos colgajos triangulares que permitieran un fácil acceso a la zona.

Se realizó una incisión del músculo hasta exponer la superficie medial del fémur, teniendo cuidado de exponer los tornillos ubicados en el fémur incidido. El tejido blando se disecó hasta las articulaciones, por las cuales se desprendería el fémur en su totalidad, utilizando tijeras, 7A y pinzas Kelly.

Una vez expuesto el fémur y los implantes ortodónticos, se evaluó clínicamente la estabilidad de los IO y se anotó en la historia clínica la presencia o no de micro movimiento, así como la cantidad de desplazamiento en mm que pudieran presentar los Mini-Implantes.

Posteriormente se amputó el fémur, haciendo cortes con el bisturí en las articulaciones. Las muestras se sumergió en formaldehido buffer al 10%, por 24

horas y refrigerado a 4°C. El recipiente de vidrio en cual reposaron las muestras se marcó con la fecha del sacrificio, la hora de inmersión y los datos del animal sacrificado así:

Identificación :
Fecha :
Hora :
Fémur : Der. ___ Izq. ____
Implante Ortodóntico : ___ Control ___ Experimental

El cadáver del animal fue manejado según los protocolos establecidos en el IBUN, donde se indica que una vez retirado el fémur y al no necesitar ninguna otra muestra, el cuerpo se congela y se entrega al sistema de desechos de la Universidad Nacional, clasificado como desecho anatomopatológico de riesgo biológico donde finalmente lo incineran.

A los especímenes mantenidos en formaldehido Buffer al 10% por 24 horas a 4° C se les realizó un baño en agua destilada y posteriormente se sumergieron en alcohol etílico al 40%. Las muestras se mantuvieron en refrigerador a 4°C bajo la responsabilidad del investigador / director de la investigación. Posteriormente se realizó la deshidratación en series de alcohol etílico de gradación creciente.

La deshidratación se hizo en forma progresiva con sucesivos baños de alcohol, cada vez menos hidratados a 4°C, consiguiendo previamente un leve vacío en los viales; a excepción del aclarado con xileno, cuyo punto de inflamación es de 24° C (lo que lo hace peligroso).

Muestras mineralizadas

- Alcohol etílico 70%, las muestras pueden permanecer varios días.
- Alcohol etílico 95%, 2 baños en un lapso de 24 horas.
- Alcohol etílico absoluto (99.5%), 3 baños de una hora cada uno.

Las muestras se introdujeron de la siguiente manera:

- Cada muestra se envolvió en gasa a manera de bolsitas, siempre suspendidas.
- Para la deshidratación se emplearon frascos anchos y de cierre hermético. Los recipientes se agitaron periódicamente para que la mezcla de alcohol y agua fuera lo más perfecta posible.
- En cada etapa la cantidad de deshidratante fue superior a 10 veces el volumen del tejido por deshidratar.

- El disolvente utilizado antes de la inclusión fue el xileno.

La inclusión de la muestra se hizo en resina Polivinílica, siguiendo el protocolo de inclusión del laboratorio ayuda a la docencia de la carrera de Odontología de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los cortes se realizaran mediante un micrótomo de rotación para tejidos duros a 80 micras. Posteriormente las muestras obtenidas se desgastaran en un dispositivo para refinamiento de muestras mineralizadas hasta obtener muestras lo más delgadas posibles (60 micras).

10.3.2 HISTOTECNIA (TINCIONES)

Las tinciones de las muestras se encaminaron a determinar mucopolisacáridos ácidos, siendo éstos polisacáridos que no tienen grupos alcohólicos en posición 1,2 glicol sino grupos ácidos carboxilos o sulfatados. Por tanto, las técnicas para determinar mucopolisacáridos ácidos fueron principalmente:

10.3.3 Hematoxilina – Eosina:

- Realizar dos baños de xileno de 10 a 15 min. c/u.
- Eliminación el solvente por sucesivos baños en: alcohol de 100°, 96°, 70° de 1 a 2 min. c/u.
- Hidratación de los cortes: en agua destilada durante 1 a 2 min.
- Tinción nuclear: en hematoxilina durante 2 a 12 min de acuerdo a la fórmula utilizada.
- Viraje de la hematoxilina: en agua corriente hasta desprendimiento total del color (3 a 5 min.).
- Lavado en agua destilada o corriente.
- Coloración citoplasmática: eosina al 0.5% o en una mezcla de eosina/floxina al 0.5% durante 15 a 30 seg.
- Lavado en agua destilada.
- Deshidratar, aclarar y montar.

Las placas obtenidas fueron evaluadas por microscopio de luz, con el fin de conocer el estado de las células alrededor del espacio del Implante Ortodóntico, para luego hacer el respectivo análisis.

Resultados: Elementos de color azul se relaciona con componentes celulares como la cromatina y órganos dependientes de Calcio; mientras que la coloración rosada corresponde al citoplasma y fibras colágenas.

10.3.4 Rojo Alizarín (Muestras Mineralizadas)

Se utilizó para identificar nódulos de calcio mediante fijación de los cristales de hidroxiapatita y fosfato de calcio en un proceso de quelación.

Fijación : formalina al 10% o formalina alcohólica.

Soluciones:

- Rojo Alizarina 2gm.
- Agua destilada 100 ml.
- Mezclar las soluciones ajustando el pH 4.1 - 4.3 utilizando hidróxido amonio 0.5%.
- Acetona 25ml
- Xileno 25ml

Procedimiento técnico:

- Se hidrató con alcohol al 70%.
- Se lavó rápidamente con agua destilada.
- Se aplicó Rojo alizarina de 30 seg a 5 min, comprobando al microscopio color rojo anaranjado.
- Se eliminó el exceso de la tinción.
- Se sumergió en acetona (20).
- Se aclaró y montó.

Resultados: Los depósitos de calcio se observaron de color rojo anaranjado.

Recolección de datos

Se diseñaron tablas por grupos (Experimental y Control) para cada una de las variables a estudiar:

- Tiempo de Carga
- Magnitud de Carga
- Estabilidad Primaria
- Estabilidad Final
- Fijación Primaria

10.4 Análisis de datos:

Se realizará un análisis descriptivo del tiempo y tipo de cicatrización en cada muestra experimental y de control en los diferentes intervalos de tiempo.

Mediante imágenes fotográficas de microscopia óptica, se realizarán lecturas histológicas describiendo los cambios que se van presentando en el tejido que rodea los minimplantes en cada muestra, se establecerá la presencia o no de depósitos de Ca y el Valor Promedio del contacto íntimo de hueso implante con su Desviación Estándar.

11 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos para la obtención de la muestra fueron realizados como parte de un estudio previo de la línea de investigación, con la participación de la Dra. Tihany Rodríguez y titulado: “Evaluación Histomorfométrica del proceso de cicatrización de Implantes Ortodónticos de titanio”, presentado en el 2012 como Tesis de Grado para obtener el título de Especialista en Ortodoncia; y conto con la aprobación previa del comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad según acta No. 0-07

El estudio tomó en cuenta todos principios científicos y éticos, contando con los recursos humanos, animales y materiales necesarios que garantizaran el bienestar del sujeto de investigación.

Los procedimientos quirúrgicos fueron realizados por profesionales con conocimiento y experiencia para proteger la integridad del sujeto de experimentación.

Esta investigación fue basada en el principio de las tres R`s (Reemplazo, Reducción, Refinamiento) descritas por Russell y Burche en 1959, donde se buscó garantizar el uso racional y respetuoso del animal experimental, *reduciendo* el número de animales usados en los proyectos de investigación, *reemplazando* el animal siempre que sea posible por otro tipo de modelos y *refinando* los procedimientos de manipulación mediante el estudio de su etiología minimizando las molestias o el dolor que pueda sufrir, y garantizando que los resultados de los proyectos de investigación sean confiables. Además se complementó con “The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animal” desarrollado por el CIOMS (the Council for International Organizations of Medical Sciences) el cual incluye los aspectos éticos de la investigación en animales.

Los animales fueron mantenidos en un Bioterio que cumple con todas las especificaciones de la ley, al cuidado de personal experto y contando con todos los recursos necesarios para su correcto mantenimiento. Se utilizó el mínimo número de sujetos de experimentación necesarios. Para los procedimientos

quirúrgicos del animal se tuvo en cuenta las disposiciones de la ley, y la eutanasia se realizó cumpliendo las especificaciones de no dolor para el sujeto de experimentación.

Tipo de riesgo para el animal en la investigación:

Acorde con las categorías para clasificar los procedimientos y las molestias que se pueden generar durante la fase de experimentación en un modelo animal, el procedimiento que se realizó en esta investigación se clasifica como: **Procedimiento Quirúrgico Menor con Supervivencia, de Complejidad y Molestias Moderadas.** (Recuperación de Anestesia General). Acorde con la invasividad del procedimiento experimental, se clasificó el procedimiento como **Categoría C** (que causan leve estrés o dolor de corta duración).

Para el desarrollo del protocolo de investigación realizado, el personal con diferentes áreas de pericia que cuenta con entrenamiento y conocimiento acerca de la etiología y respuestas normales de la especie (Ratas Wistar) del laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del IBUN (al cual hace parte el director de trabajo de investigación), está capacitado para reconocer temprana y efectivamente dolor y estrés en los animales, lo que aseguró un diagnóstico temprano y oportuno de cualquier complicación relacionada con los procedimientos realizados.

Sin embargo, y reconociendo que la recuperación a los procedimientos quirúrgicos pueden variar individualmente, los riesgos en que pueden incurrir los animales en la investigación y su clasificación son los siguientes:

Dolor (Riesgo Bajo)

La prevención y alivio del dolor asociado a los procedimientos quirúrgicos, es un componente esencial y se tuvo en cuenta durante todas las fases del protocolo de investigación. Durante la fase Quirúrgica, se manejó anestesia con Vaporizador con Isofluorano al 5% y analgesia (Meloxicam 0.2 mg/kg de peso sub cutáneo). Durante la fase post quirúrgica se mantuvo el protocolo de analgesia con Meloxicam subcutáneo durante tres días o hasta que el animal lo requiriera.

Estudios realizados previamente en el Laboratorio, así como el piloto realizado para esta investigación, demostró que este protocolo es suficiente para el manejo del dolor, sin embargo cada animal fue supervisado individualmente y si era necesario se aplicaron los correctivos pertinentes .

Infección (Riesgo Bajo)

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron en el área blanca dispuesta para tal fin, respetando el protocolo para procedimientos quirúrgicos del Laboratorio de Biomiméticos y Reactivos Biológicos del IBUN, donde se hace énfasis en los métodos de esterilización específicos, que son seleccionados con base en las características físicas de los materiales que se van a utilizar. El autoclave fue el método escogido para la esterilización del instrumental, materiales quirúrgicos, ropa quirúrgica y guantes (todos los paquetes esterilizados contaron con indicadores que identificaban la esterilización apropiada). Para los equipos que se utilizaban en el área quirúrgica, se empleó sustancias químicas en solución esterilizante con tiempo de contacto adecuado.

El animal fue intervenido quirúrgicamente sobre campos estériles y la limpieza de la superficie a intervenir se realizó mediante la utilización de alcohol al 70% e Isodine. Una vez finalizado el procedimiento quirúrgico se inició cubrimiento antibiótico siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio con Penicilina sódica intramuscular.

Durante el post operatorio inicial, el animal fue revisado clínicamente tres veces al día y supervisado con cámaras por 24 horas. Posteriormente y luego de la cicatrización de la herida, el animal se evaluó clínicamente 3 veces por semana. El examen clínico hizo énfasis en la detección de cualquier signo relacionado con infección de la herida.

Perdida de Movilidad (Riesgo Bajo)

Inmediatamente después del postoperatorio la rata debía ser capaz de apoyarse en sus patas traseras y beber líquido. Inicialmente era posible que presentara algo de cojera y arrastra un poco las patas en sus movimientos de translación, pero a medida que se recuperaba y en ausencia de dolor e inflamación, el animal debía recuperar el 100% su capacidad de movimiento.

Para supervisar la adecuada recuperación del movimiento, durante el examen clínico se colocaron los animales sobre la mesa de trabajo de la sala de animales y se dejaban mover libremente, anotando los hallazgos en la historia clínica. Aleatoriamente se grabó la recuperación de los animales.

Exposición de la herida (Riesgo bajo)

En el post operatorio inicial la rata podría morder los bordes de la herida y romper la sutura, exponiendo así el musculo y aumentando el riesgo a una infección. Por tal motivo se hicieron modificaciones a la sutura externa, utilizando sutura reabsorbible Vicryl 4-0 (para no tener que retirar puntos) y realizaron una técnica

de sutura intradérmica modificada para no dejar sutura visible que pudiera ser arrancada o cortada por el animal.

Adicionalmente, la limpieza con clorhexidina de la superficie intervenida luego de intervención quirúrgica, así como la limpieza de la herida realizada durante el post operatorio inmediato, tuvo como objetivo adicional al control de infección, no dejar rastros de sangre que la rata pudiera detectar de modo que se mordiera o lastimara.

Durante el examen clínico se evaluó el estado de la herida, y en caso de detectar exposición del musculo, el animal se llevó a la sala blanca en donde se realizó inducción anestésica y bajo anestesia general se suturo nuevamente con previa limpieza de la herida. Cuando fue necesario se prolongó el cubrimiento antibiótico, o en caso de haberse terminado, se inició nuevamente.

12 RESULTADOS

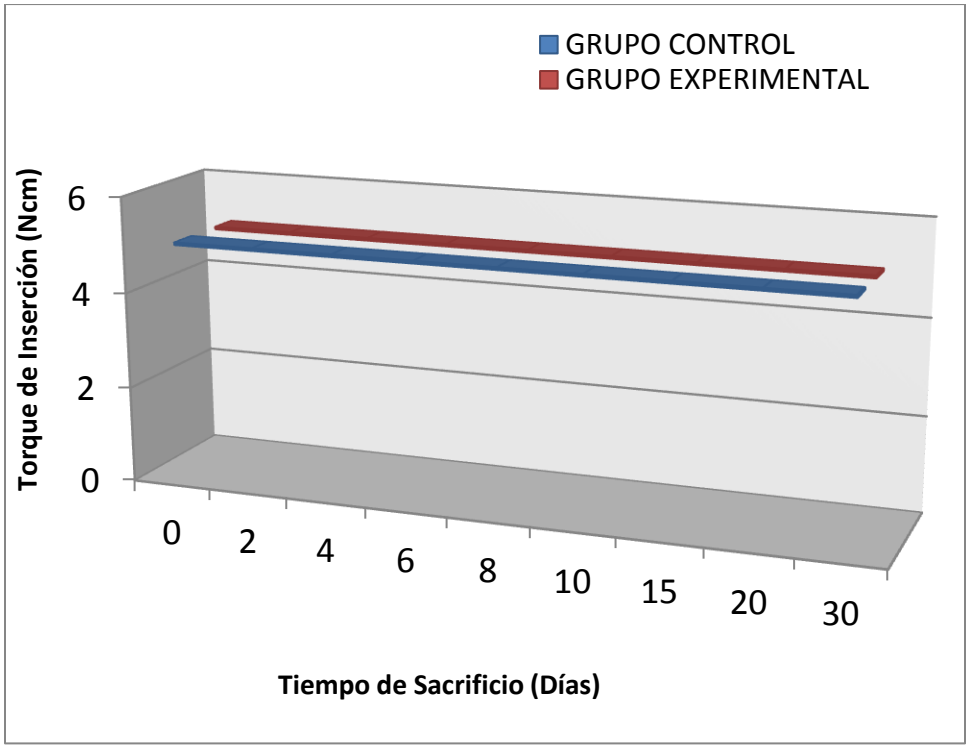
Todas las ratas intervenidas se recobraron satisfactoriamente luego de la anestesia y durante el periodo de cicatrización no presentaron ninguna complicación.

El 100% de los IO del Grupo Control y Experimental con carga inmediata de 150 gr, obtuvieron estabilidad inicial y final (n = 50 IO). El porcentaje de Éxito para el total de la Muestra fue del 100%. (Tabla 1)

Estabilidad Inicial y Final. Porcentaje de Éxito								
Día	**Control**			**Experimental**			**TOTAL**	
	Estabilidad Inicial(n)	Estabilidad Final (n)	% Éxito	Estabilidad Inicial(n)	Estabilidad Final (n)	% Éxito	n	%
0	2	2	100	---	---	---	2	100
2	2	2	100	4	4	100	6	100
4	2	2	100	4	4	100	6	100
6	2	2	100	4	4	100	6	100
8	2	2	100	4	4	100	6	100
10	2	2	100	4	4	100	6	100
15	2	2	100	4	4	100	6	100
20	2	2	100	4	4	100	6	100
30	2	2	100	4	4	100	6	100
TOTAL							50	100

Tabla 1. Estabilidad Inicial y Final. Número y Tasas porcentuales por grupos y día.

El torque de inserción fue el mismo para todos los Implantes de la muestra (5 Ncm), resultado del protocolo de Inserción de implantes estandarizado previamente. (Gráfica 2)



Gráfica 2 Descripción de los valores de Torque de Inserción en Ncm por Grupos y día de Sacrificio.

12.1 Muestras Mineralizadas

Se estandarizó el proceso de inclusión, corte y tinción para muestras mineralizadas de Implantes Ortodónticos de Ti6Al4Va para Anclaje Esquelético insertadas en el fémur de Ratas Wistar SPF. Se obtuvieron dos (2) cortes de hueso Mineralizado e Implante Ortodóntico de 80 micras de espesor por cada muestra incluida en resina, utilizando un micrótomo Leica DM 1000. Los cortes obtenidos fueron desgastados en un dispositivo Leica para refinamiento de muestras mineralizadas, hasta obtener muestras lo más delgadas posible, de 60 micras aproximadamente. Un espécimen por muestra fue teñido con Tinción de rutina (Hematoxilina-Eosina) y el otro con Rojo Alizarín. (Figura 3.)

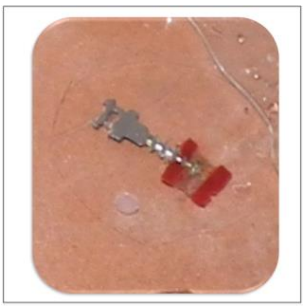


Figura 3. Fotografía Espécimen Implante y Hueso Mineralizado (Corte 60 micras sobre lámina porta objetos de vidrio). Tinción Rojo Alizarín. Tinción Hematoxilina-Eosina

Al examinar las muestras al microscopio, se observó que para la mayoría de las muestras el desgaste fue insuficiente para hacer una descripción a nivel celular

12.1.1 Tinción Hematoxilina-Eosina

En los cortes mineralizados con tinción Hematoxilina – Eosina se observó la cortical viable y zonas de contacto entre hueso e implante en todas las muestras analizadas.

Para el Día 2, no se observan signos de inflamación, ni necrosis; se evidencian espículas óseas en ambas superficies adyacentes al IO, asociadas al proceso de inserción del Implante. Para todas las muestras observadas, la fijación primaria del IO se hace a expensas de uno o máximo dos contactos por lado a nivel de la cortical. No se observan diferencias evidentes para las muestras control y experimental. Celularidad no valorable. (Fig 4).

Para el día 4, no fueron evidentes signos de inflamación o necrosis, se mantienen las espículas óseas en ambas superficies adyacentes al IO. Para el grupo experimental, en el lado de tensión, se mantienen los espacios originales con solo uno o dos puntos de contacto hueso-Implante a nivel de la cortical; para la zona de presión, aumenta el área de contacto hueso-implante, y disminuyen los espacios. Celularidad no Valorable.(Fig 5, Fig 6, Fig 8).

Para el Día 6 fue evidente la presencia de infiltrado celular inflamatorio y conformación de un coágulo de fibrina en las muestras Control, hallazgo que no se observó para el mismo día en las muestras Experimentales No se observan espacios entre la superficie del IO y la cortical ósea en la zona de Presión. Celularidad no valorable. (Fig 7, Fig 8).

Para el Día 8, se observó infiltrado inflamatorio en el lado de presión y tensión del grupo experimental, siendo menor en el lado de tensión; en la muestra Control no

fueron evidentes signos de inflamación. El área de contacto hueso-implante es mayor para la zona de presión de las muestras experimentales. Celularidad no valorable. (Fig 9).

Para el día 10 se observa neoformación de tejido óseo tipo woven en lado de tensión y presión de las muestras experimentales; así como en la superficie distal y proximal de las muestras control. Para el lado de presión de las muestras experimentales el área de contacto es mayor que para el resto de las áreas estudiadas. Se observa hueso rico en osteocitos (Fig 10).

Para el día 15, se observa en la cortical, presencia de trabéculas óseas pequeñas en torno al tornillo. Neoformación de tejido óseo tipo woven en lado de presión y tensión en contacto íntimo con el IO. Se observan escasos osteocitos en la zona de tensión del grupo experimental. Para la muestra control se presentó desalojo de gran parte del tornillo, lo cual no permite comparar con la muestra experimental (Fig 11).

Para el día 20 se aprecia aposición ósea a ambos lados del tornillo de tipo continuo. Hay neoformación de trabéculas pequeñas de tejido osteoide tipo woven, siendo mayor en lado de tensión. No hay señales de reabsorción. Para el grupo control se observa formación de tejido óseo tipo woven en contacto íntimo en superficie distal y próxima del IO. Celularidad no valorable (Fig 12).

Para el día 25 aposición ósea a ambos lados del tornillo de tipo continuo, Neoformación de trabéculas pequeñas de tejido osteoide tipo woven en contacto íntimo en lado de presión y tensión, y en ambas superficies del grupo control Tejido óseo más maduro separado del IO en superficie proximal (Fig 13)

En el día 30 Tejido óseo maduro en contacto íntimo en zona de presión y tensión para la muestra experimental. En la muestra control se observa tejido óseo maduro en torno al IO con pequeña separación en superficie proximal (Fig14).

12.1.2 Tinción Rojo Alizarín

Los depósitos de Calcio sobre el tejido óseo y sobre la superficie del implante, entendidos como parte del proceso de formación ósea se describe mediante la lectura de muestras mineralizadas tratadas con tinción Rojo Alizarín.

En el día 0 se observan corticales intactas, tejido óseo sigue la forma del implante, osteocitos conservados sin diferencias en el lado distal o proximal para el grupo control

En el Día 2 no se evidencian depósitos de Ca en ninguna de las superficies analizadas (Fig. 4).

Para el Día 4 sólo hay evidencia de una superficie que presenta una línea roja continua de mineralización sobre la superficie del IO (Control) (Fig 5, Fig 6, Fig 8).

En los Día 6 y 8 se evidencia un comportamiento similar entre la muestra Control y el lado de tensión de la muestra Experimental, en donde se pueden observar depósitos de Ca en la superficie del IO y del tejido óseo (línea roja continua de mineralización), mientras en el lado de presión se observan puntos rojos aislados sobre la superficie del tejido óseo (Fig 7, Fig 8, Fig 9).

En el día 10, se observa neoformación de tejido óseo tipo woven, sin signos de reabsorción, con pequeñas líneas de aposición sobre la superficie del hueso, tanto para la muestra control, como para experimental. En la zona de tensión del grupo experimental, se observa captación de calcio sobre la superficie del implante (se observa una línea roja más nítida que para el día 8) (Fig 10).

En el día 15, para el grupo experimental, se mantienen signos de aposición ósea, sin evidencias de reabsorción. Se puede observar contacto íntimo en lado de presión y tensión, con pequeños espacios en igual proporción para ambos lados. (Fig 11)

En el día 20, para el grupo experimental, se aprecia aposición ósea de tipo continuo a ambos lados del tornillo. Hay neoformación de trabéculas pequeñas de tejido osteoide tipo woven, sin señales de reabsorción. Hay contacto íntimo hueso – implante en ambos lados del IO. Para el grupo Control se evidencia formación de tejido óseo tipo woven en contacto íntimo tanto en la superficie distal como en la proximal del IO. (Fig 12)**.**

En el día 25 se observan trabéculas de tejido osteoide con aspecto más maduro, en torno al tornillo y entre ambas corticales, contacto íntimo hueso – implante en lado de presión y tensión, se observa presencia de osteocitos. Para las muestras del grupo control, se observa tejido óseo similar al experimental separado del IO en superficie proximal y en contacto íntimo en superficie distal (Fig 13).

En el día 30 se observa tejido óseo maduro con abundantes osteocitos, una tinción acentuada de tipo incremental en contacto íntimo con el implante en la zona de presión y tensión. Para la muestra del grupo control, se observa similar tejido óseo maduro, con osteocitos; contacto íntimo en superficie distal, se observa separación en superficie proximal (Fig 14).

Depósitos de Ca						
Día	**CONTROL**			**EXPERIMENTAL**		
	SUPERFICIE	**IO**	**TEJ**	**SUPERIFICE**	**IO**	**TEJ**
2	Proximal	0	0	Presión	0	0
	Distal	0	0	Tensión	0	0
4	Proximal	++	0	Presión	0	0
	Distal	0	0	Tensión	0	+
6	Proximal	++	++	Presión	0	+
	Distal	0	0	Tensión	+	+
8	Proximal	+	0	Presión	0	+
	Distal	+	+	Tensión	++	+
10	Proximal	+	+	Presión	+	+
	Distal	+	+	Tensión	++	+
15	Proximal	++	++	Presión	+	+
	Distal	++	++	Tensión	++	+
20	Proximal	++	++	Presión	++	++
	Distal	++	++	Tensión	++	++
25	Proximal	++	++	Presión	++	++
	Distal	++	++	Tensión	++	++
30	Proximal	++	++	Presión	++	++
	Distal	++	++	Tensión	++	++
CONVENCIONES						
0	No se observan depósitos de Ca.					
+	Puntos rojos aislados de mineralización					
++	Línea roja continua de mineralización					

Tabla 2.Descripción de Depósitos de Ca sobre tejido óseo e IO según las superficies analizadas y los Días de Cicatrización

Se logró cuantificar la superficie del implante inmersa en la cortical y determinar el porcentaje de contacto íntimo entre el IO y el tejido óseo. (Tabla 3)

Contacto Íntimo Hueso – Implante									
Día	**CONTROL**			**EXPERIMENTAL**					
				Presión			**Tensión**		
	n superficies	% Promedio	DS	n superficies	% Promedio	DS	n superficies	% Promedio	DS
0	2	15.9	9.3	0	----	----	0	----	----
2	2	22.05	6.5	4	52.05	11.68	4	27.35	5.19
4	2	21.15	6.3	4	52.97	5.03	4	21.57	5.81
6	2	17.00	6.36	4	58.05	5.53	4	17.72	3.65
8	2	15.61	0.91	4	85.00	5.02	4	16.10	1.53
10	2	58.92	29.33	4	79.42	8.45	4	62.63	20.79
15	2	64.07	25.66	4	78.50	14.25	4	75.21	17.45
20	2	60,45	3.1	2	71.84	13.32	2	78.58	8.99
25	2	64.09	2.5	4	74.30	19.15	4	79.84	17.58
30	2	67.00	18,1	4	71.02	9.17	4	89.79	9.1

Tabla 3.Contacto Íntimo Hueso-Implante por grupos (Control y Experimental). Valor Promedio y Desviación Estándar

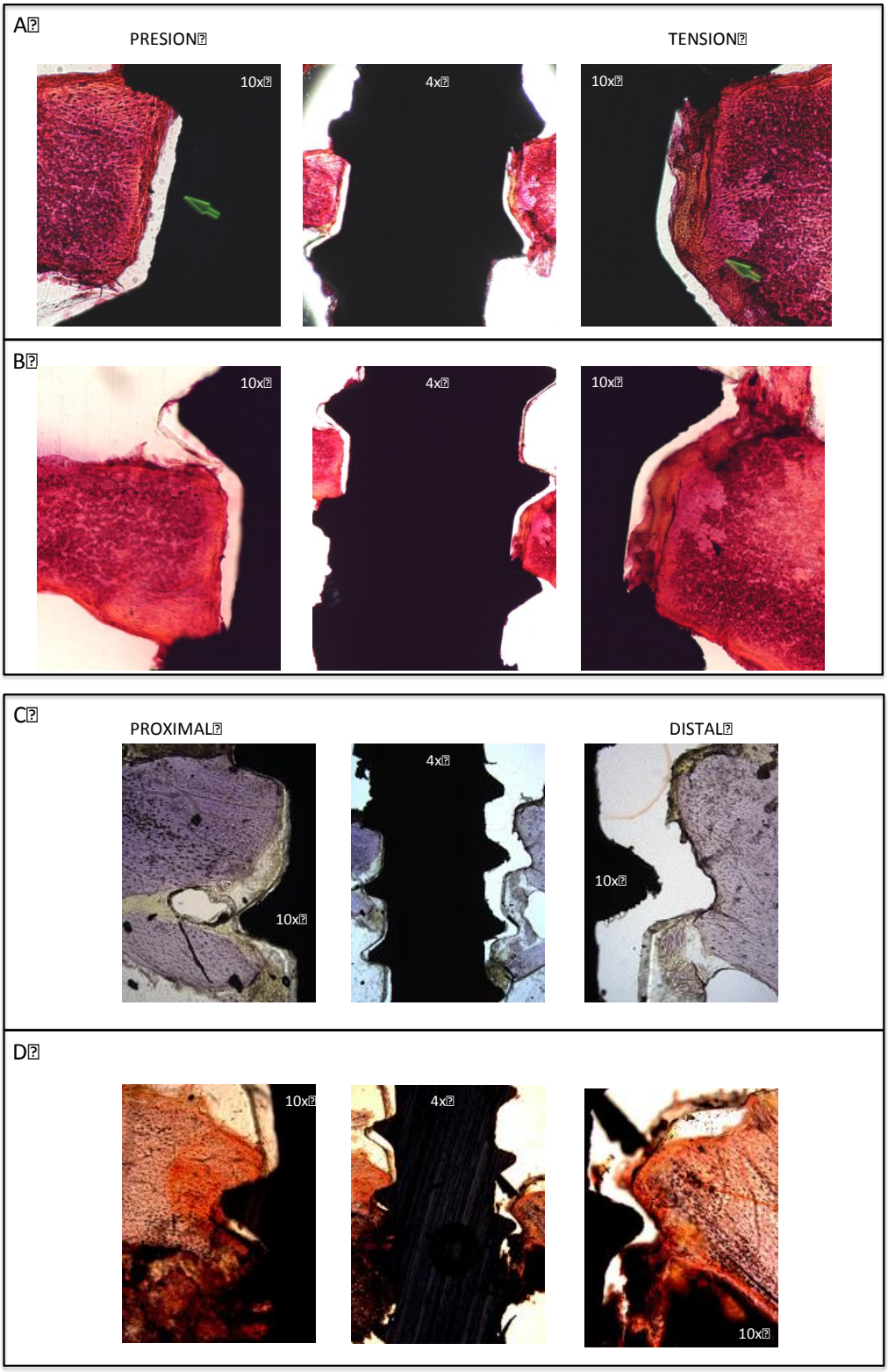


Figura 4. Muestras Mineralizadas Día 2 . A Grupo E. Coloración H-E. Se observa cortical viable en ambos lados (presión y tensión), signos de inflamación y necrosis no evidentes. B. Grupo E. Coloración RA. Se observa cortical viable en ambos lados (presión y tensión), al enfocar el tejido y el IO no se observan depósitos de Calcio (Ca). C. Grupo C Coloración H.E. D. Grupo C. Coloración R.A. Se observa cortical viable en ambos lados. Características similares al grupo E.

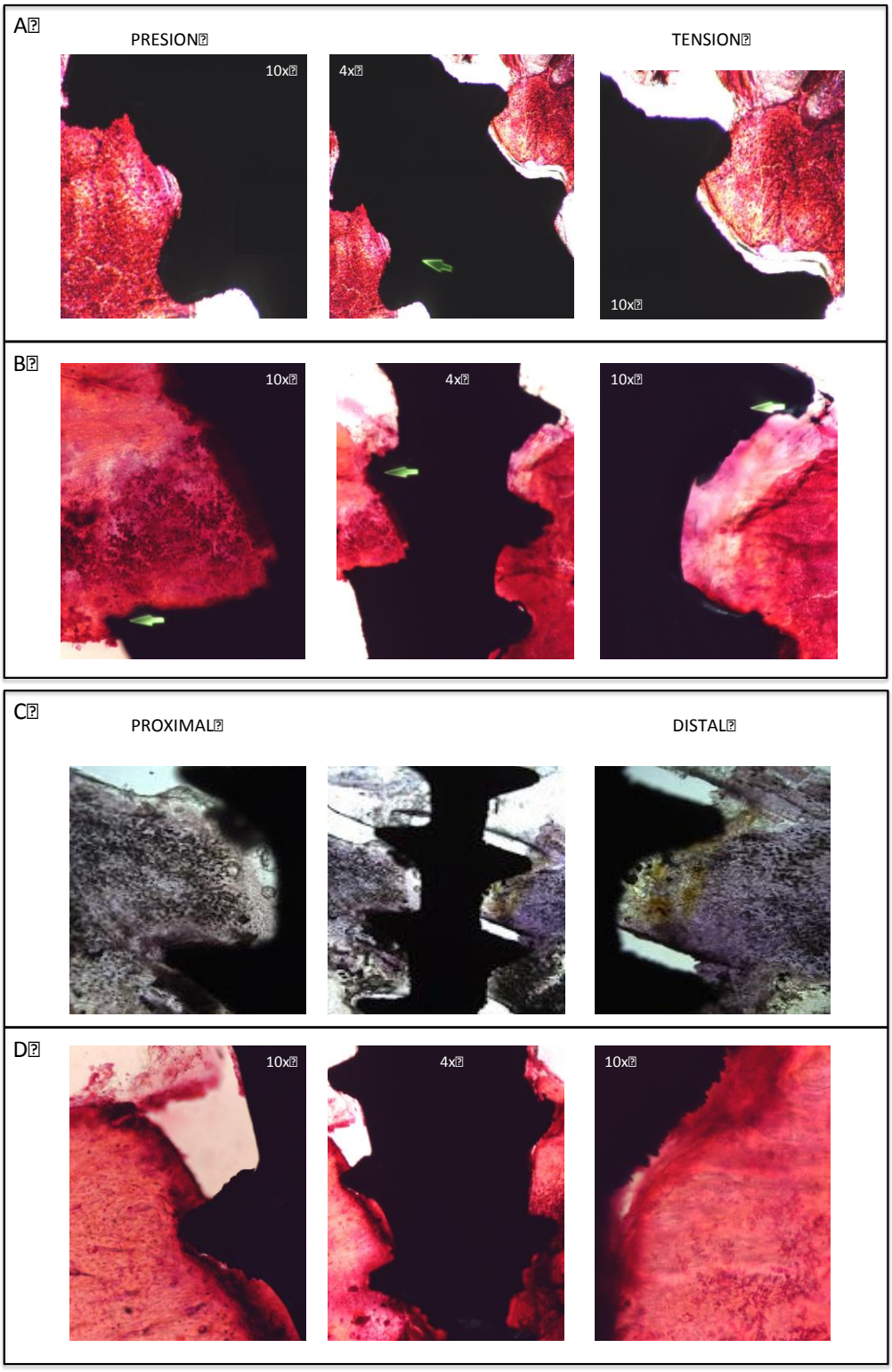


Figura 5. Muestras Mineralizadas Día 4. A.B Grupo Experimentañ. C.D Grupo control. A Coloración H.E. B. Coloración RA. D. Coloracion RA. C. Coloración HE. Para todas las muestras se observan ligeras microfracturas en ambos lados y un moderado espacio en la interfase hueso-IO para la zona de Tensión (GE) y para la zona P y D en el GC.. Contacto íntimo en la Interfase H-I en la zona de Presión de la muestra Experimental. D Ausencia de signos de inflamación o necrosis.

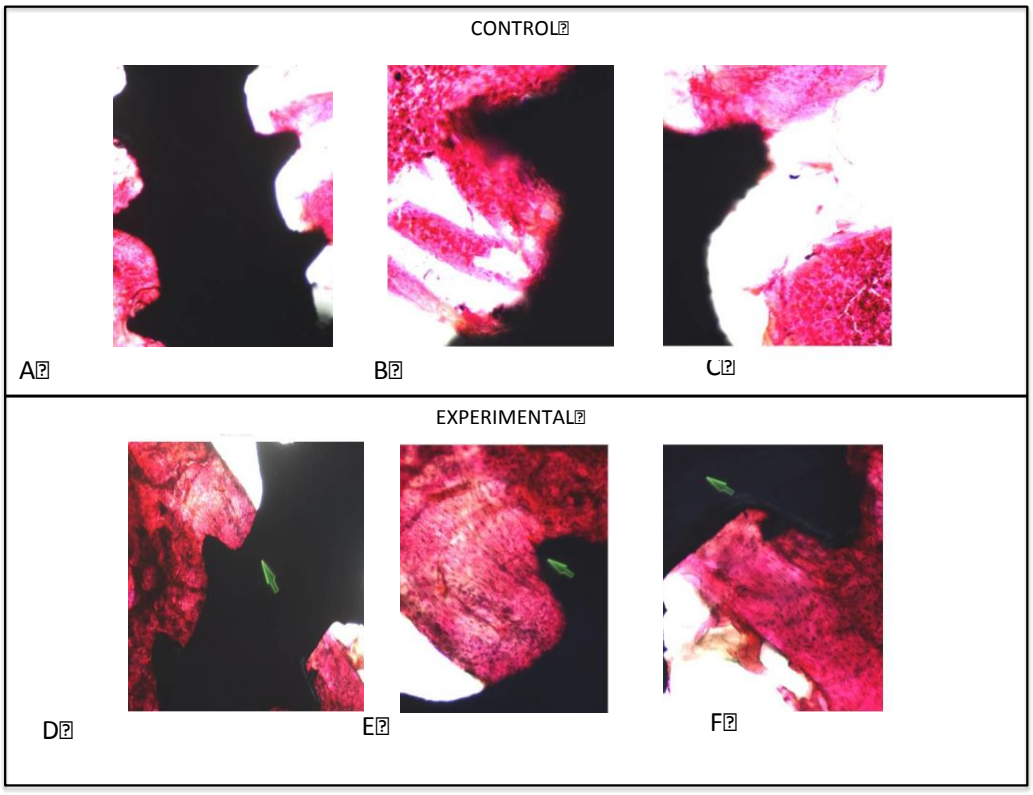


Figura 6. Muestras Mineralizadas Día 4. Coloración H.E. (A, B, C Control; D, E, F: Experimental) A. Se observa cortical viable en ambos lados (proximal y distal), no se observan signos de inflamación, ni necrosis. B y C Se observa ligeras microfracturas en ambos lados y un moderado espacio en la interfase hueso-IO. D Ausencia de signos de inflamación o necrosis. E. Ligeras microfracturas en la cortical externa y un contacto íntimo entre el hueso-IO. F. Se observan ligeras microfracturas en la cortical externa, y un espacio moderado en la interfase hueso-IO.

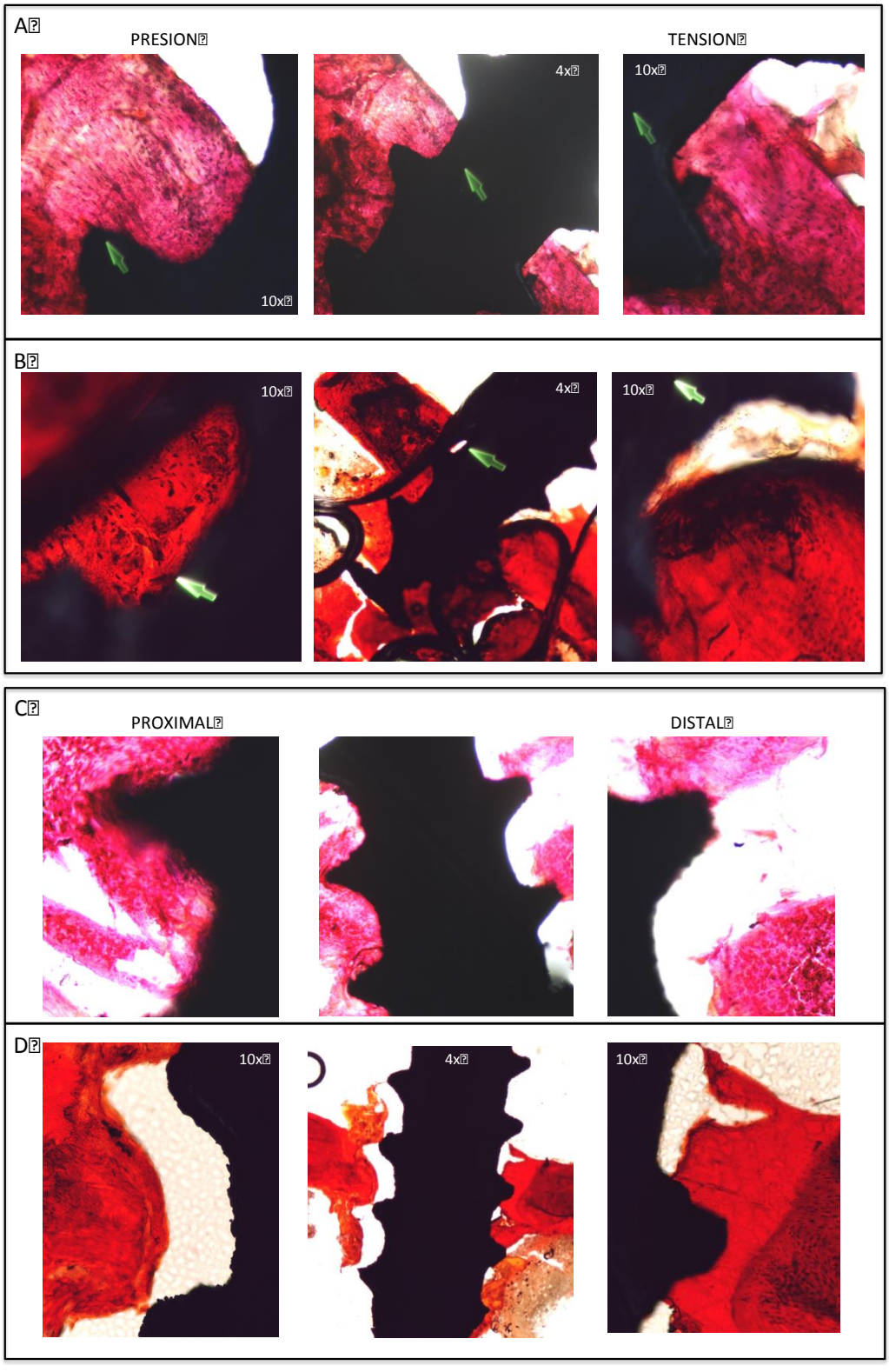


Figura 7. Muestras Mineralizadas Día 6. (A, B, Experimental; D, E, Control) **A. HE** Ausencia de signos de inflamación o necrosis. Ligeras microfracturas en la cortical externa y un contacto íntimo entre el hueso-IO en la zona de presión. Se observan un espacio moderado en la interfase hueso-IO en la zona de Tensión. **B. RA** Se evidencia una línea roja continua sobre la superficie del tejido óseo, ausencia de depósitos de Ca sobre la superficie del IO. Se observa contacto íntimo entre Hueso-IO en el lado de Presión. Evidencia de una línea roja continua sobre la superficie del implante en la zona de tensión. **C**. Se observa cortical viable en ambos lados (proximal y distal),. Se observa moderadas microfracturas en ambos lados y un moderado espacio en la interfase hueso-IO. **E**. Se observa un punteado rojo no continuo sobre el tejido óseo maduro

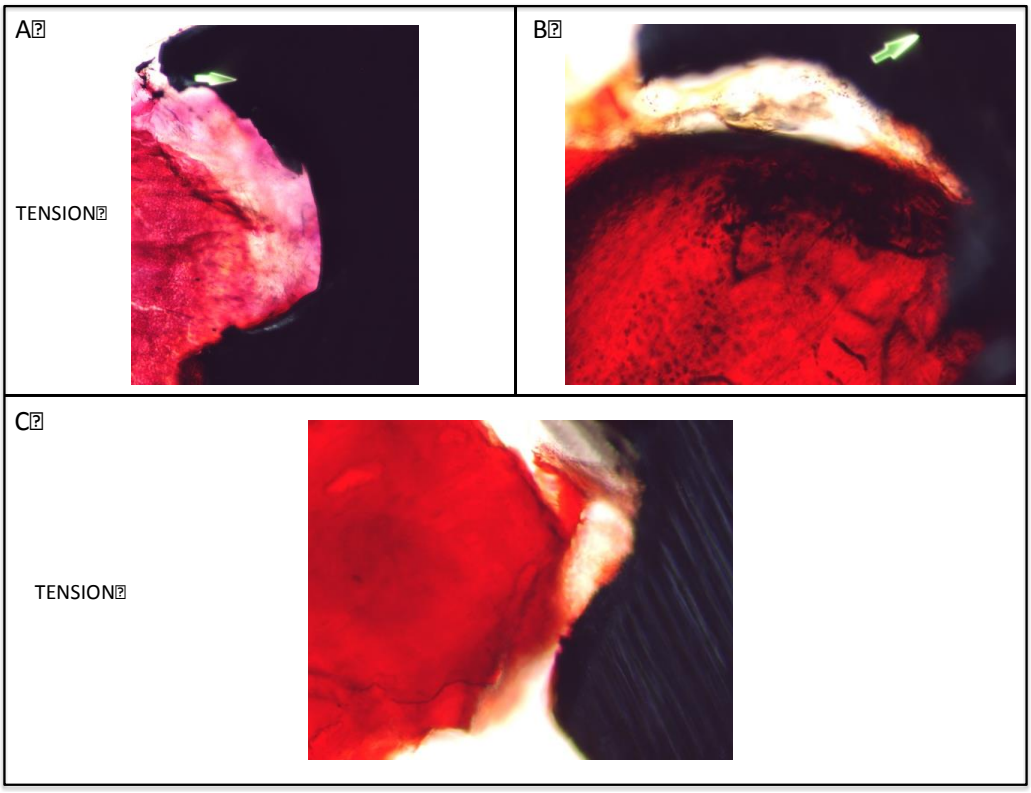


Figura 8. Muestras Mineralizadas. Grupo Experimental Zona de Tensión. Tinción Rojo Alizarín A. Día 4. Se evidencia captación de iones de calcio en la superficie de implante. B. Día 6. Captación de la tinción del RA en la superficie del implante y la superficie del hueso. C. Captación de la tinción en la superficie del implante y evidencia de neo formación ósea en la superficie ósea (color más anaranjado).

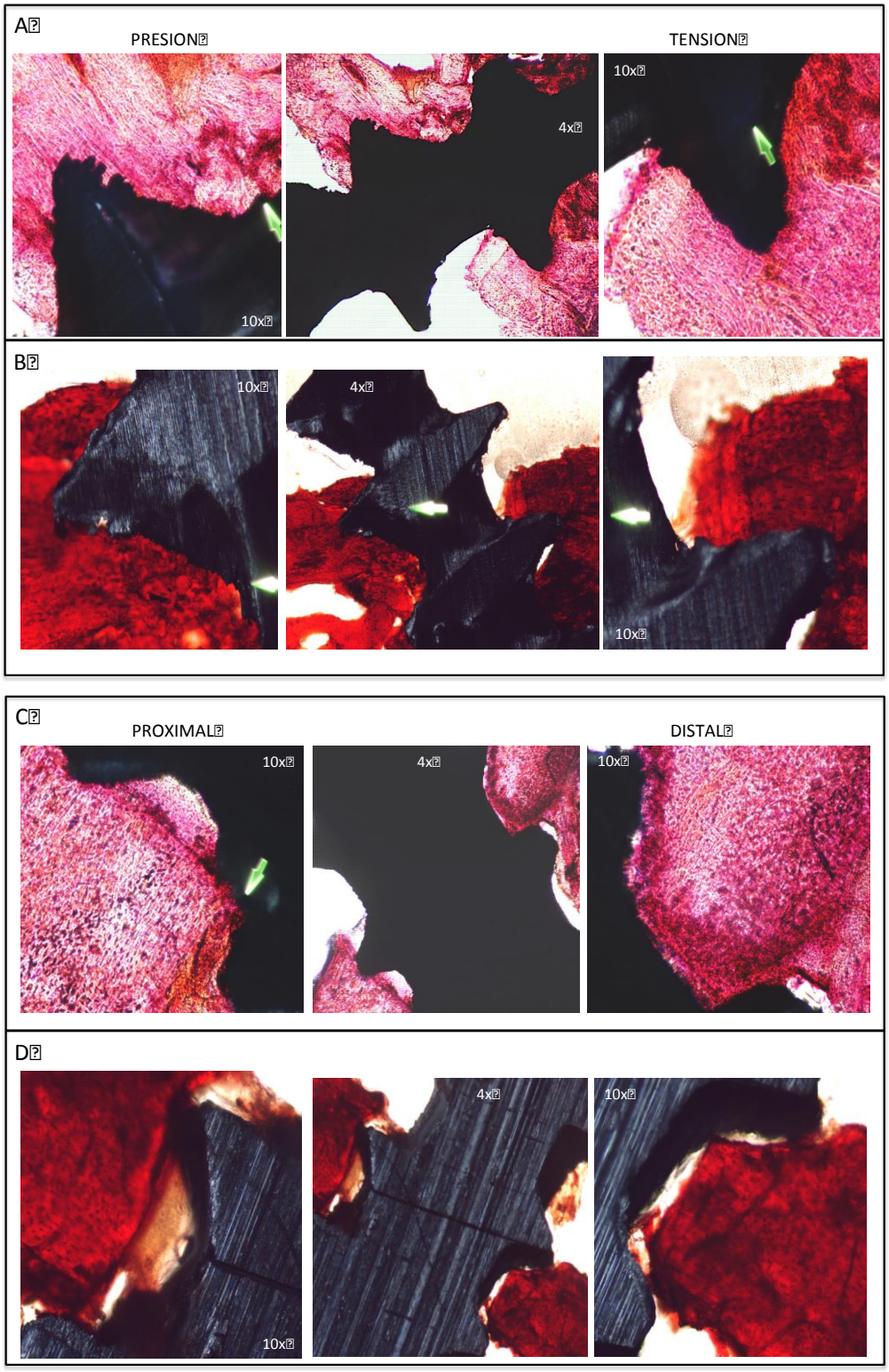


Figura 9. Muestras Mineralizadas Día 8. (A, B, Experimental; C,D, Control) **A**. Coloración HE. Se observa cortical viable en ambos lados (presión – tensión) Infiltrado inflamatorio en ambos lados, siendo mayor en el lado de presión que en tensión. Ligeras microfracturas en la cortical externa, contacto moderado entre el hueso-IO en la zona de tensión. Se observan moderadas microfracturas en la cortical externa, y un contacto íntimo entre hueso-IO. en la zona de Presión. B. Coloración RA. Se observa una línea roja continua sobre la superficie del IO y del tejido óseo. C. Contacto Moderado y hueso viable en ambos lados. D. Depósitos de calcio en la superficie del Implante (en menor proporción a la zona de tensión del grupo Experimental).

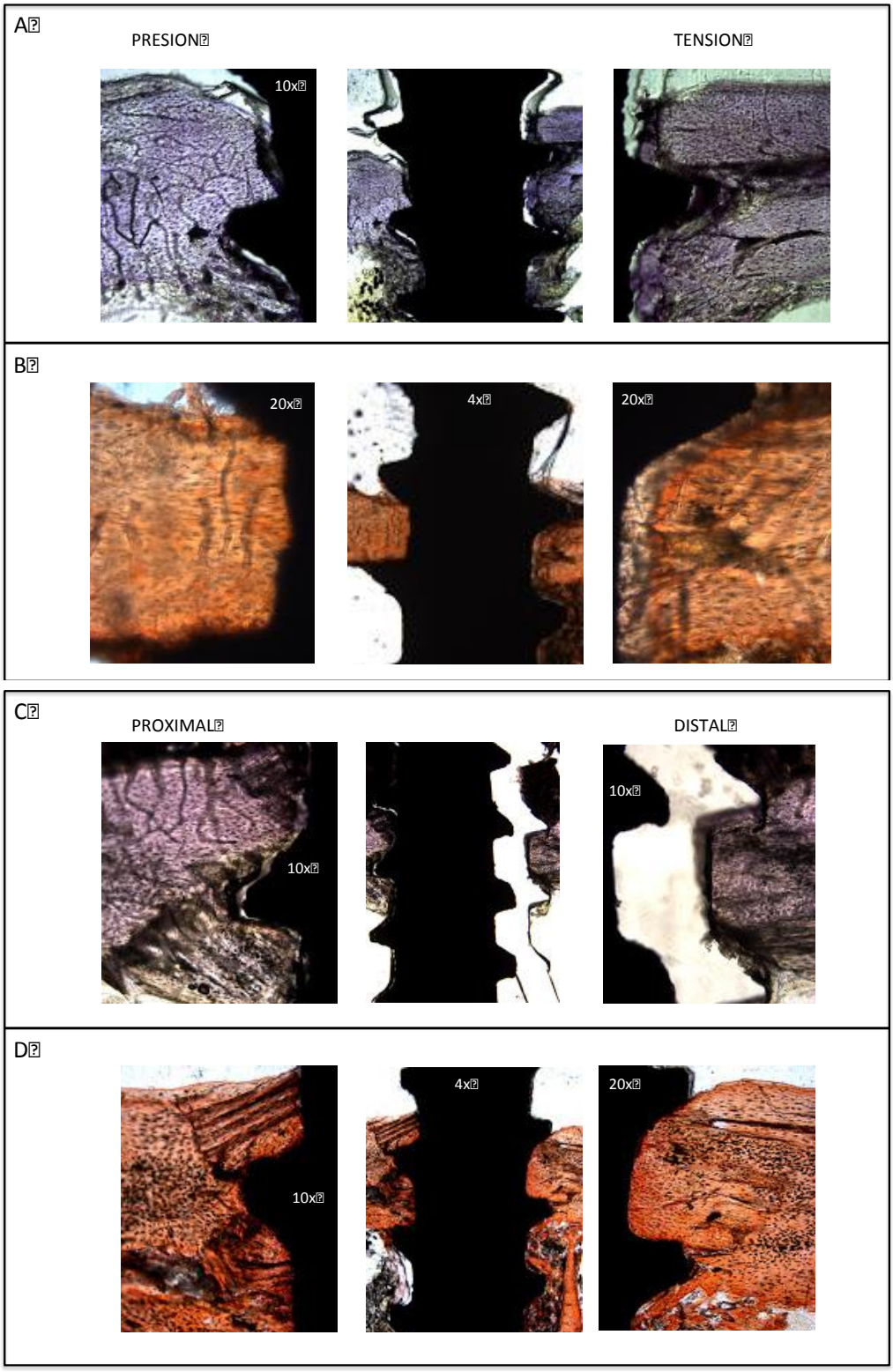


Figura 10. Muestras mineralizadas DIA 10. (A, B, Experimental; C,D, Control) **A**. Coloración HE. Neoformación de tejido óseo tipo woven en lado de presión y tensión, siendo mayor el contacto íntimo en lado de presión,sin señales reabsortivas. **B.** Coloración RA. neoformación de tejido óseo tipo woven, contacto íntimo en lado de presión y tensión. **C.** Contacto íntimo en superficie proximal con IO, espacio entre superficie distal del IO y el tejido óseo. D. Formación de tejido óseo irregular tipo woven en contacto íntimo en ambos lados del minimplante

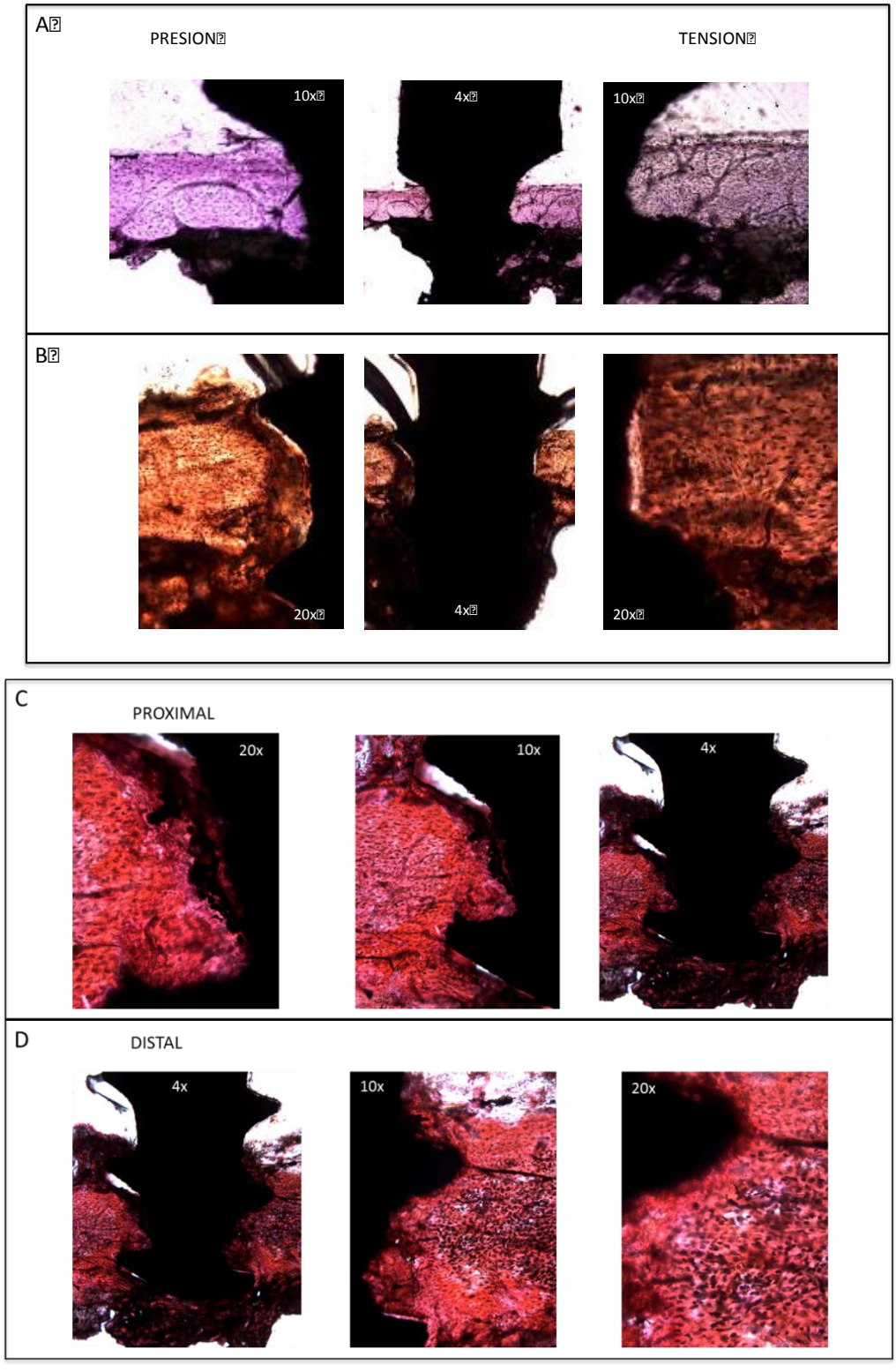


Figura 11. Muestras mineralizadas DIA 15. (A, B, Experimental; C,D, Control) **A**. Coloración HE. Presencia de trabéculas Oseas pequeñas en torno a todo el tornillo. Neoformación de tejido óseo tipo woven en lado de presión y tensión en contacto íntimo con el IO. **B.** Coloración RA. Signos de aposición ósea entre IO y hueso, Contacto íntimo en lado de presión y tensión con pequeños espaciosn. **C. y D.** Desalojo de gran parte del IO de la cortical, se observa contacto óseo en zona apical del IO siendo mayor en superficie Distal

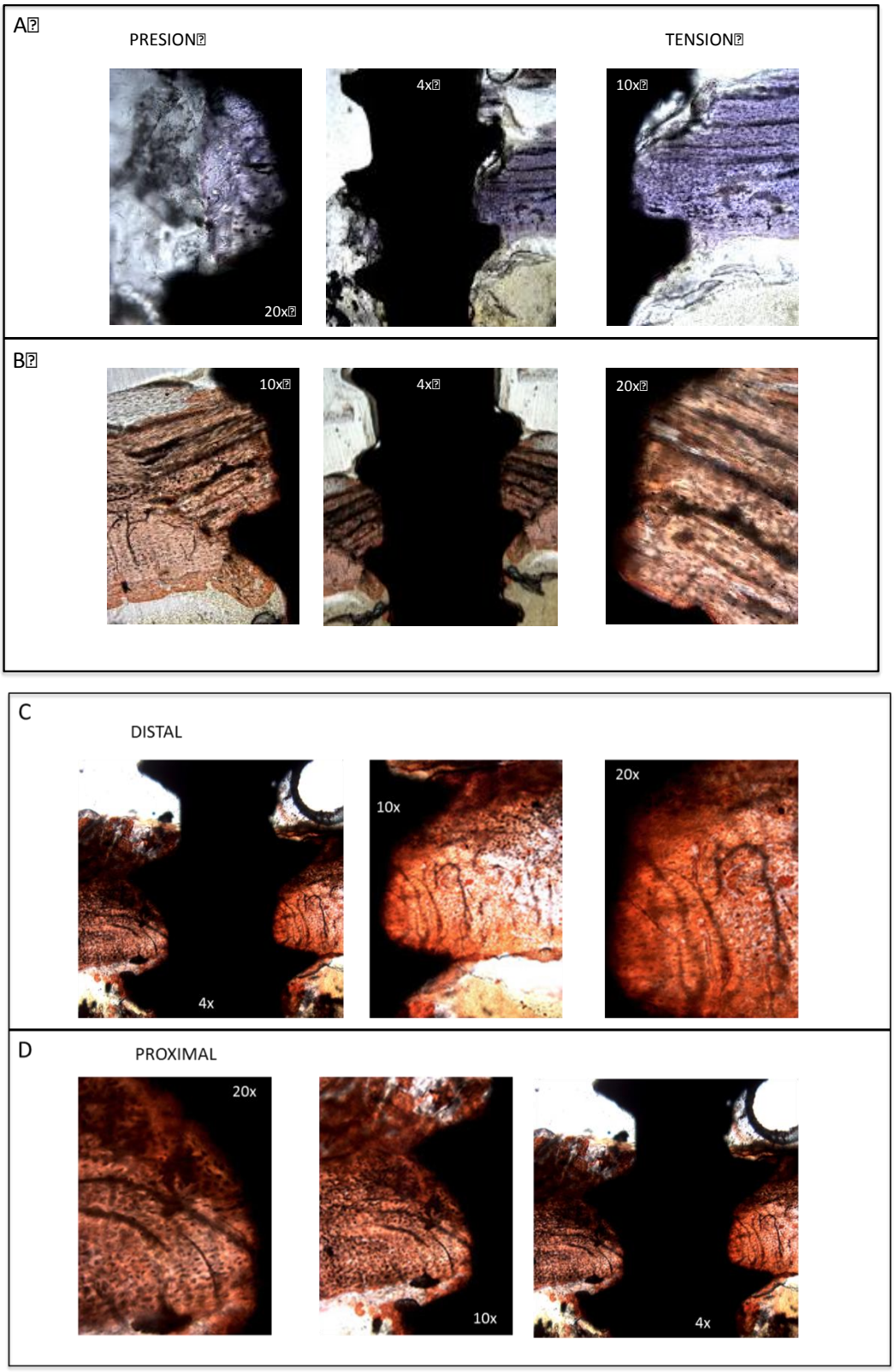


Figura 12. Muestras mineralizadas DIA 20. (A, B, Experimental; C,D, Control) A. Coloración HE. Neoformación de trabéculas pequeñas de tejido osteoide tipo woven, siendo mayor en lado de tensión. B. Coloración RA. Se aprecia aposición ósea a ambos lados del tornillo de tipo continuo, Neoformación de trabéculas pequeñas de tejido osteoide tipo woven, contacto íntimo en ambos lados. C y D. Formación de tejido óseo tipo woven en contacto íntimo en superficie distal y próxima del IO.

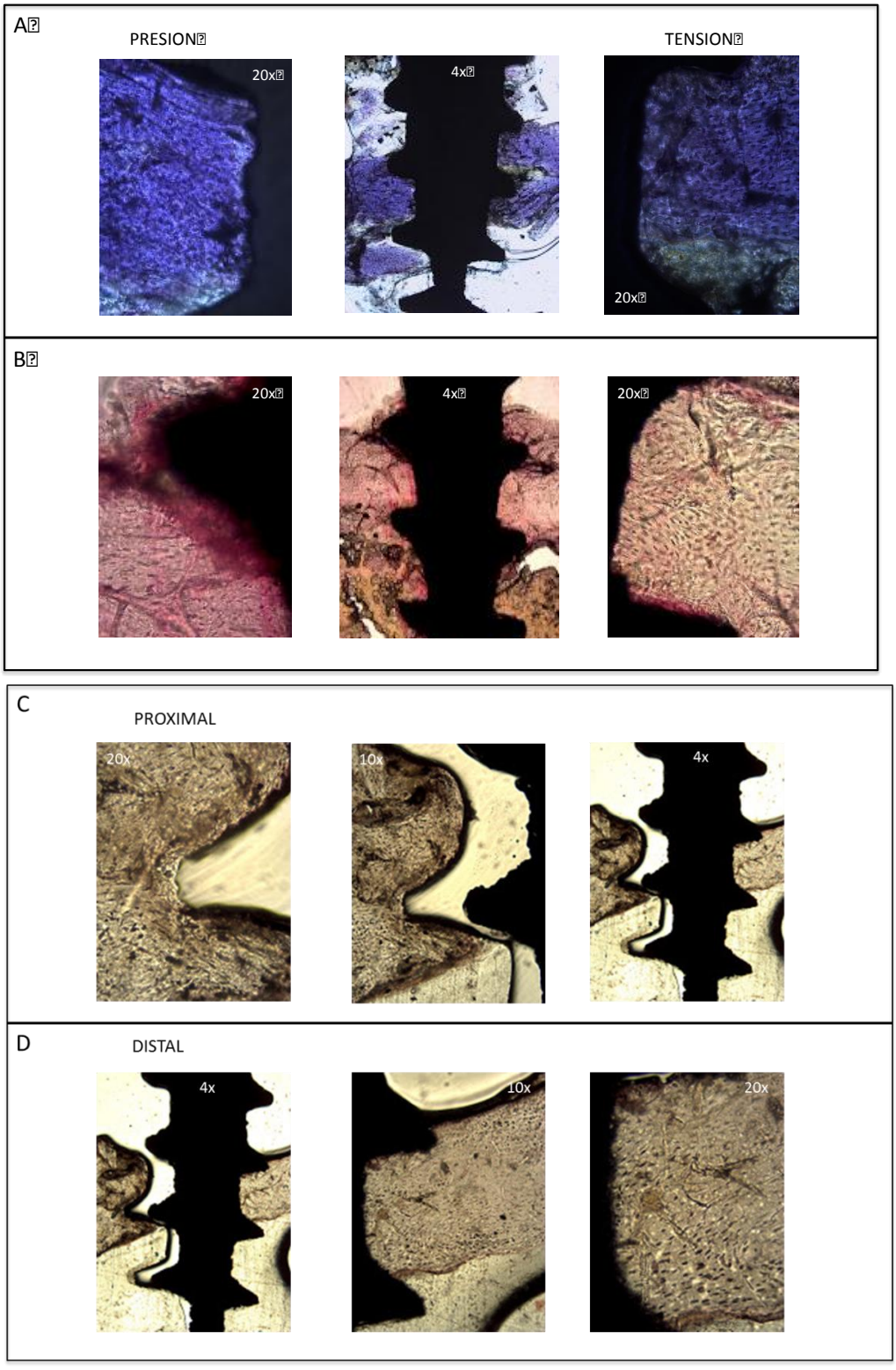


Figura 13. Muestras mineralizadas DIA 25. . (A, B, Experimental; C,D, Control) A. Coloración HE. Aposición ósea a ambos lados del tornillo de tipo continuo, Neoformación de trabéculas pequeñas de tejido osteoide tipo woven en contacto íntimo en lado de presión y tensión. B. Coloración RA. Aposición de trabéculas de tejido osteoide con aspecto más maduro, en torno al tornillo y entre ambas corticales, contacto íntimo en lado de presión y tensión, se observa presencia de osteocitos. C. Tejido óseo más maduro separado del IO en superficie proximal. D. Formación de tejido óseo más maduro en contacto íntimo en superficie distal

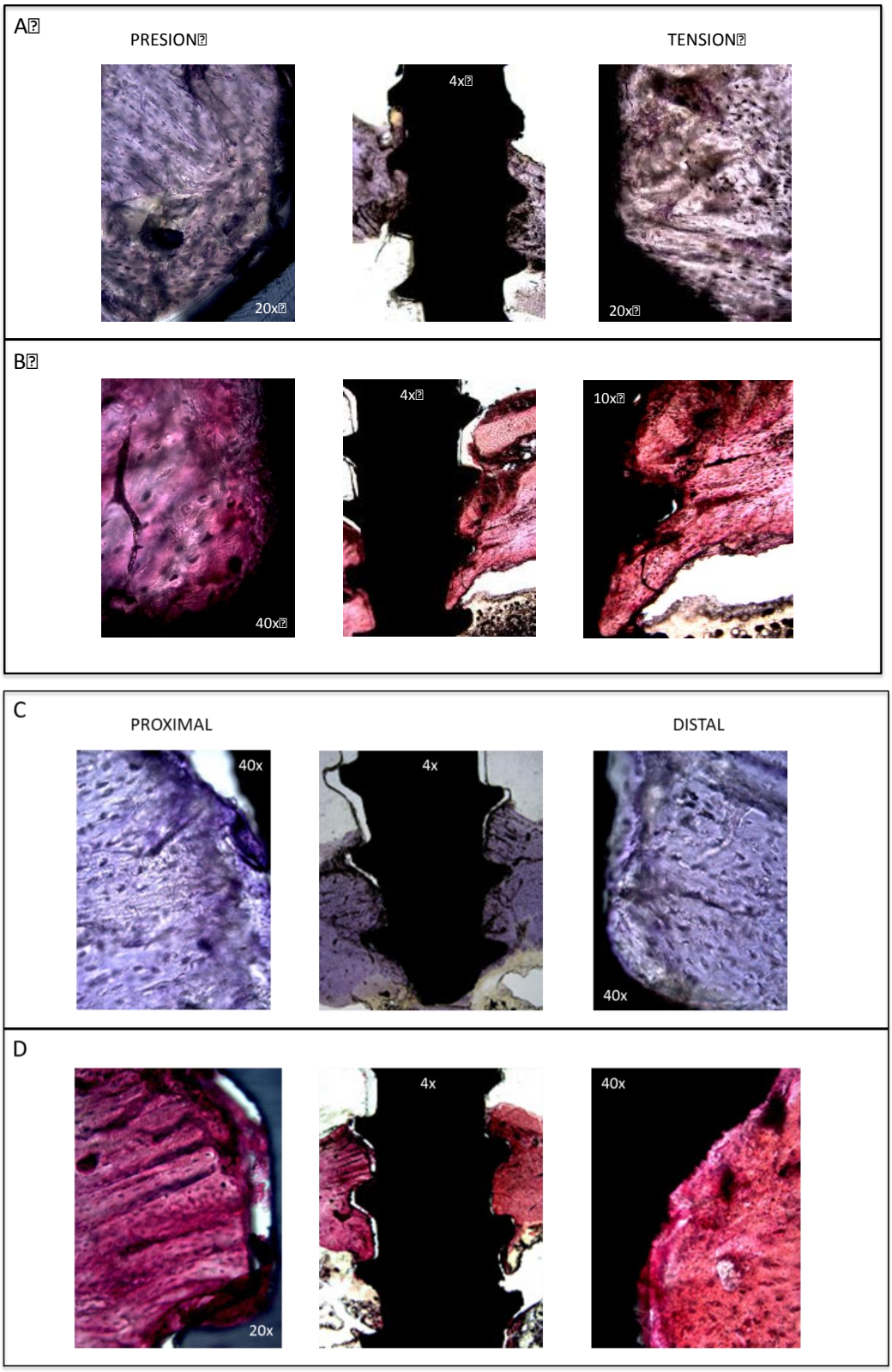


Figura 14. Muestras mineralizadas DIA 30. A,B Experimental; C,D, Control) **A**. Coloración HE. Tejido óseo maduro en contacto íntimo en zona de presión y tensión. **B**. Coloración RA. Tejido óseo maduro con abundantes osteocitos, intimo contacto en zona de presión y tensión con pequeña separación en zona superficial de tensión. **C.** Tinción HE, tejido oseo maduro alrededor del IO, en Proximal pequeño espacio entre IO –Hueso, en Distal contacto intimo con IO. **D.** Tinción RA, Tejido óseo maduro en torno al tornillo con abundantes osteocitos, separación en superficie proximal, en Distal contacto íntimo.

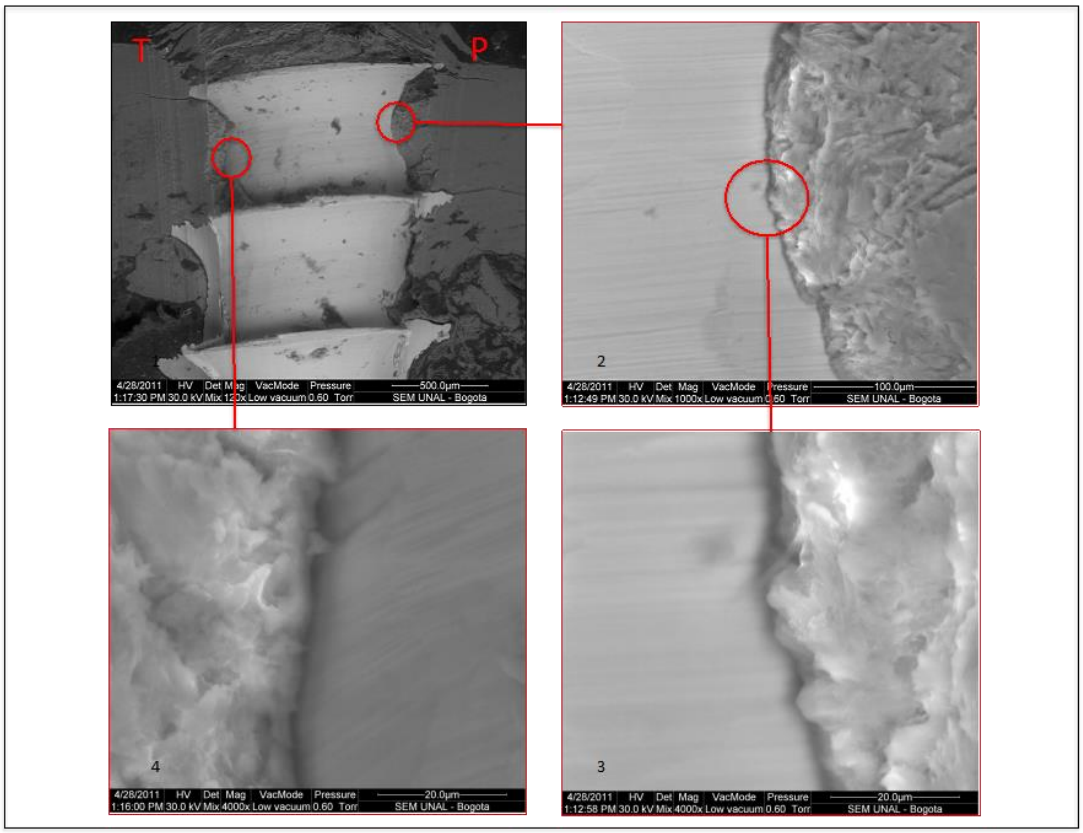


Figura 15. Muestra experimental 45 días con carga inmediata. Imágenes obtenidas con microscopio Electronico de Barrido, zonas de Presión y Tensión. Muestra (2) Zona de presión a 1000x (3) zona de Tensión a 4000 x evidenciando área de oseointegración del implante Ortodóntico. (4) Zona de Presión a 4000x evidenciando área de oseointegración del implante Ortodóntico

13 DISCUSIÓN

En la literatura muchos estudios corroboran una mayor índice de fracaso de los implantes ortodónticos en hueso de poca densidad (33) (34). Esto se acentuaría en el hueso de cortical delgada y poca densidad trabecular, debido a que el hueso poco denso puede dañarse fácilmente durante la osteotomía o durante la inserción, con la consiguiente falta de estabilidad primaria (35)

La calidad ósea que se encuentra en el fémur de ratas Wistar SPF corresponde a una cortical delgada de alta densidad ósea (grosor promedio de 1.2 mm) y núcleo esponjoso de baja densidad (Densidad Tipo 3 según la clasificación de Lekholm y Zarb, 1985). Si se tiene en cuenta la sensación o percepción táctil de la dureza percibida durante el fresado de la osteotomía previa a la colocación del implante, el tipo de hueso cortical seria D-1 (Densidad tipo 1 según la clasificación de Misch) (36). Este tipo de corticales delgadas son un reto para el clínico que pretende mantener estabilidad primaria del aditamento y aplicar una carga Ortodóntica inmediata. Sin embargo, para el total de la muestra estudiada se logró estabilidad primaria, y la posibilidad de aplicar una fuerza ortodóntica como carga inmediata para el grupo experimental, asi mismo el modelo animal escogido fue adecuado para analizar el proceso de cicatrización de implantes ortodónticos a nivel de la cortical.

La densidad ósea, incluida dentro un concepto más amplio como lo es la calidad ósea, que engloba otros factores como: la arquitectura (grosor de la cortical, características de la red trabecular), las propiedades biomecánicas (escala, forma, anisotropía, conectividad, etc.) y las propiedades del remodelado o recambio del hueso; es uno de los factores de oseointegración y éxito implantológico mas importantes (29) (30) *(* (31)*)* (32)

Chen y colaboradores en el 2007, en una revisión sistemática llegan a la conclusión de que los Mini implantes son efectivos como anclaje esquelético, y que el éxito de estos aditamentos depende de lograr estabilidad mecánica inicial y una carga ortodóntica adecuada en cantidad y calidad. (37)

Buschang en 2009, describe como la inserción de un mini implante genera stress y tensión en el hueso, lo cual trae como consecuencia daño tisular circundante, caracterizado por presencia de micro fracturas que pueden afectar el proceso de cicatrización del aditamento. El tejido afectado durante la inserción va a requerir de reparación, ya que produce degeneración del tejido circundante y necrosis en la interfase hueso implante. Si este daño es muy extenso, se puede producir micro movimiento y desalojo del tornillo. (38)

Teóricamente, la estabilidad primaria se puede optimizar si se disminuye el torque de inserción y se maximiza la resistencia al desalojo del tornillo. Para lograr este objetivo, Motoyoshi en el 2006 recomendó realizar un fresado previo con una broca de menor diámetro al del implante, incluso para implantes auto perforantes. (39)

Estudios realizados mediante el método de elementos finitos, han demostrado que la fijación de los implantes como anclaje esquelético para movimientos ortodónticos, es suficiente cuando se realiza únicamente en la cortical externa del hueso receptor (40). Aunque el hueso tiene un comportamiento aceptable de adaptación a la carga, cuando se aplica una fuerza Ortodóntica sobre el aditamento, este comportamiento se ve alterado conforme se varía el ángulo de inserción del mini implante Ortodóntico. En consecuencia, se ha determinado que los ángulos de inserción que permiten una mejor distribución de los esfuerzos en la estructura ósea, en este tipo de tratamientos, son los valores de 15 y 90º (41).

Para el experimento todos los implantes fueron insertados a 90º respecto a la cortical, con el fin de distribuir mejor las cargas en el hueso y favorecer estabilidad del tornillo. Con el mismo fin, se realizó fresado previo a la inserción de los implantes Ortodónticos auto perforantes en el fémur de las ratas Wistar.

En la presente investigación, al realizar el análisis histológico se describió presencia de pequeñas líneas de fractura a lo largo de la cortical en todas las muestras estudiadas para el periodo comprendido desde la inserción hasta el día 8. Hallazgos que coinciden con los descritos por Buschang en 2009, y que para este caso en particular no afecto la estabilidad inicial de los tornillos.

Las muestras del grupo control para el día 0, permitieron observar como la estabilidad primaria del tornillo se mantenía por la presencia de un contacto a cada lado de la muestra que no superaba un área de contacto del 25.2%. Para el día 0 y para el día 2 (tanto para la muestra control como para la muestra experimental) se observaba un espacio entre el cuerpo del Implante y el hueso, resultado del fresado previo con una broca de 1.3 mm de diámetro. Las roscas en el área de la cortical fueron las que por su contacto con la cortical lograron la estabilidad primaria.

A partir del día 4 para la muestra experimental, el área de contacto en la zona de presión aumento progresivamente, llegando a valores del 90,02% para el día 8. Los espacios en la zona de tensión para la mismas muestras se mantenían y el área de contacto para el día 8 obtuvo un promedio de 16.10%. Investigaciones previas en la línea de investigación, evidenciaron que el implante ortodóntico bajo

carga inmediata con fuerzas leves sufría una leve inclinación en dirección de la fuerza que nunca supero los 0.2 mm para ninguna de las muestras estudiadas. (17) (21) (16)

La observación del comportamiento de la zona de presión hasta el día 8, hace suponer que la fuerza ejercida, permite inclinación del tornillo en dirección de la fuerza, por la mínima resistencia que opone la pequeña área de contacto inicial y aprovechando el espacio que existe por la perforación con la broca de 1.3mm de diámetro entre el hueso y el cuerpo del Implante Ortodóntico. La inclinación nunca se ha registrado superior a 0.2 mm, porque el cuerpo del tornillo se encuentra logra una mayor área de contacto (la totalidad de la cortical ósea) que impide la posibilidad de mayor desplazamiento. De esta forma se aumenta la fijación primaria del implante y se favorece el establecimiento de una fijación secundaria posterior.

Durante la primera fase de cicatrización después de insertar el implante en el hueso, la estabilidad primaria decrece debido a la actividad osteoclástica que remueve el hueso alrededor del implante (área de necrosis superficial, que se espera mínima por la acción de un procedimiento quirúrgico atraumático). Sin embargo, la acción de una fuerza leve que fija el hueso sobre la superficie de presión, mantiene el proceso inflamatorio en la zona de presión, pero permite una resolución más rápida en la zona de tensión (que no se encuentra bajo la acción de la fuerza). Casale & Acosta en el 2009, describieron en el mismo modelo animal, haciendo análisis histológico sobre muestras desmineralizadas, que a los 15 días se observaba en el área de tensión hueso maduro que suponía evidencia de oseointegración en algún porcentaje. A partir de ese momento el implante no se puede seguir desplazando en dirección de la fuerza, convirtiéndose en un anclaje absoluto, e inicia la resolución del proceso inflamatorio en el área de contacto hueso – implante en la zona de presión, con la posibilidad de fijación secundaria en esa área. Hallazgo que se hizo evidente para el día 45 tanto en las muestra desmineralizadas de ese experimento, como en las muestras mineralizadas analizadas ultraestructuralmente al microscopio electrónico de barrido para el día 45 en los estudios de Casale & Saavedra en 2011 y Casale & Rivera en 2011 (17) (15). (Fig 15)

Insertar el IO genera una herida con pérdida de estructura a nivel de la cortical (Día 0), que a su vez desencadena la migración de células inflamatorias hacia la interface (42)para la formación de un coágulo que detenga el flujo de sangre, soporte las células osteoprogenitoras, y establezca un contacto entre hueso e implante (22), (43).

Después de la hemostasia y formación del coágulo, la fibrinólisis se produce con la formación de un estroma de tejido conectivo suelto, que soporta la angiogénesis y precede al reclutamiento de osteoblastos a partir de las células madre de la médula ósea o superficie perióstica (25), (44) . Este proceso se evidenció en las imágenes de Hematoxilina eosina (Fig. 9) con un infiltrado inflamatorio sobre la superficie ósea adyacente al IO y corticales viables con vasos sanguíneos y células vivas. En contraste a estos resultados Nilo (45) observa zonas de necrosis a lo largo de toda la interface Hueso-IO y sólo a partir de la tercera semana inician cambios reparativos y de aposición ósea.

Una adecuada oseointegración está condicionada a la aceptación del implante por parte de los tejidos vivos, así como a la formación de nuevo hueso alrededor del implante. Para que se pueda dar, depende de dos fenómenos: osteoinducción y osteoconducción. La osteoinducción es el reclutamiento de células madres que de alguna manera son estimuladas a diferenciarse como células formadoras de matriz ósea. Si estas células logran colonizar la superficie del implante dental entonces se dice que esta superficie es osteoinductiva. Por su parte, la osteoconducción se define como la formación de hueso sobre la superficie del implante (46).

Una adecuada morfología superficial permite que las células osteogénicas se adhieran y se diferencien sobre la superficie del implante, creando así depósitos minerales que constituyen la base de la formación del nuevo hueso (47). La biomineralización es esencial para el rendimiento óptimo del implante, pues crea una conexión viable entre el hueso vivo y la superficie del implante que precede la oseointegración. La habilidad de las células osteoblástica para producir nódulos de mineralización fue evaluada mediante la tinción rojo Alizarín, que teñía de rojo los depósitos de mineral.

Captación de la tinción roja se detectó sobre la superficie del hueso (evidenciando neoformación ósea), así como sobre la superficie del implante. Los hallazgos de líneas de captación de la coloración rojo Alizarín sobre la superficie del implante en el área de tensión a partir del día 4 y hasta el día 10, marca la presencia de calcio en esa área, evidenciando adhesión y diferenciación de osteoblastos sobre la superficie del implante, así como el proceso de biomineralización (formación de nódulos mineralizados sobre la superficie). Aunque la respuesta temprana de las células osteoblástica aquí presentada no necesariamente predice el grado de oseointegración de un determinado sustrato, si permite dar explicaciones a una posible presencia de oseointegración temprana en la zona de tensión.

Debido al grosor de las muestras, no fue posible valorar celularidad en todas las láminas estudiadas, sin embargo se describe presencia de tejido osteoide tipo woven en mayor proporción en el lado de tensión de la muestra Experimental para el día 15, con presencia de escasos osteocitos. Característica que también fue reportada previamente en el estudio con muestras desmineralizadas por Casale & Acosta en el 2009 (15). Captación positiva de la tinción rojo Alizarín, con presencia de una línea roja de mineralización sobre el implante y sobre el tejido óseo tanto para el grupo control, como para el grupo experimental (lado de tensión) se evidencio a partir del día 15.

Tejido Óseo maduro en contacto íntimo en la zona de presión y tensión para la muestra experimental y para el grupo control se describe para las muestras del día 30.

El porcentaje de Contacto Hueso – Implante aumento progresivamente desde el día 0 para el grupo control, comportamiento que fue similar para la zona de tensión del grupo experimental. Para el grupo experimental en la zona de presión, el porcentaje hueso – implante mantuvo valores altos desde el inicio, aunque tuvo tendencia a aumentar ligeramente a medida que paso el tiempo.

Investigaciones experimentales (48), (45), (25), (42) concluyen que la tensión física, equilibrada y regulada entre hueso-IO, estimula la formación ósea, apoyando la hipótesis sobre la ventaja de cargar inmediatamente los implantes.

El análisis de las muestras mineralizadas revelan puntos de contacto íntimo de la cortical ósea con el IO, que son responsables de la fijación primaria del mismo; y a su vez, este contacto permite la neo formación ósea en la interface. Los resultados corroboran el mecanismo osteoinductivo de los IO de Ti6Al4Va (25), al observar un línea roja continua sobre la superficie del implante en la tinción Rojo Alizarín.

Zhang y col en su estudio en perros Beagle encontró entre 1 y 3 semanas un incremento en la oseointegración, la densidad del hueso trabecular y la fuerza de remoción, alcanzando el máximo valor 5 y 7 semanas después de la inserción (10). Los hallazgos clínicos e histológicos de Buchter y col describen una buena oseointegración después de aplicar una fuerza inmediata durante 22 días (49); por el contrario el estudio de Glaucio y col realizado en conejos, reportan que no existe diferencia significativa en cuanto a la fijación de los minimplantes de titanio sometidos a una carga inmediata de 1 N (102.gr/f) comparado con su muestra control, donde evaluaron la interface de cicatrización en microscopía electrónica de barrido y el torque de remoción, además refieren que no hubo diferencias significativas en cuanto a la formación ósea en las zonas de comprensión y tensión (49)

Los resultados indican que la carga inmediata con fuerzas leves no afecta negativamente la estabilidad y el proceso de cicatrización de los tejidos que circundan los minimplantes Ortodónticos de titanio.

Todavía existe controversia acerca del uso de Implantes de titanio o de Acero para anclaje esquelético. La utilización de implantes de acero como anclaje esquelético se justifica porque son menos propensos a la fractura y el proceso de cicatrización da como resultado Fibrointegración y no oseointegración (característica que algunos autores califican de indeseable por la posibilidad de fractura del tornillo en el momento de su retiro). Estudios comparativos llegan a la conclusión de que el rendimiento general del material de los Implantes Ortodónticos de Acero Inoxidable es inferior a los IO de titanio, debido a su bajo resistencia a las fuerzas tensiles (50)

En general se acepta que ambos materiales son biocompatibles, pero alrededor de los implantes de Acero (Ss) se forma una capa de tejido conectivo mientras que se produce un contacto directo del hueso a los implantes con aleaciones de titanio o de titanio puro, verdadera oseointegración. (50) (51) Christensen y col analizaron el efecto de la aleación Ti frente a tornillos Ss respecto a su fijación mecánica y al crecimiento del hueso en un modelo de cerdos enanos. Reportan que los implantes de aleaciones de Titanio tienen varias ventajas potenciales sobre los Ss, como la alta bioactividad y una mayor flexibilidad que pueden mejorar el crecimiento óseo y fijación mecánica. La unión en la interfase hueso-implante fue significativamente mayor para los tornillos de Ti que para los de SS, que se explica por el hecho de que los tornillos de Ti tenían un crecimiento mayor de hueso (33% en comparación con los de Ss). No reportan correlación entre el torque de remoción de los tornillos y la fuerza de desalojo, lo que indica que la estructura ósea periférica alrededor del tornillo no se vio afectada por la aleación del metal. (50)

Gritsch y col reportan en su estudio una respuesta ósea similar ante los minimplantes de titanio y de acero. En su estudio insertan minimplantes de acero y titanio en cerdos en crecimiento, haciendo una activación inmediata con una fuerza de 100 gr/f. Realizaron un análisis histológico e histomorfométrico evaluando el porcentaje de contacto hueso-implante, y encontraron valores similares para los dos materiales, así como una tasa de supervivencia similar. (52) De forma similar el estudio de Brown y col realizado en conejos reporta no haber encontrado diferencias significativas en la respuesta histológica entre los dos tipos de minimplantes. (4)

El presente estudio utilizó una carga inmediata, basado en anteriores estudios en animales donde se encontró que no afecta negativamente la estabilidad de los

minimplantes, Investigaciones experimentales como las de Cooper, L. y col, Vanegas, J, G. M Serra, concluyen que la tensión física, equilibrada y regulada entre hueso-IO, estimula la formación ósea, apoyando la hipótesis sobre la ventaja de cargar inmediatamente los implantes (22), (25) (42). Los resultados en esta investigación corroboran que la carga inmediata favorece el proceso de cicatrización del tejido circundante al Implante Ortodóntico (IO) ya que a partir del Día 6 inician los depósitos de Ca a ser evidentes sobre la superficie del IO y del tejido óseo en la muestra Experimental (lado Tensión) y Control; que a su vez desarrollaron un comportamiento similar durante los días evaluados. El estudio de Freire y col realizado con minimplantes de titanio en perros Beagles aplico una fuerza de 250 gr/f en 3 tiempos diferentes: de forma inmediata, a la semana y a las 3 semanas de curación cada uno con su control, y fueron seguidos por un período de activación de 12 semanas, encontró que los valores de contacto de hueso-implante no fueron significativamente diferentes entre el experimental y los grupos de control demostrando además que las cargas inmediatas o tempranas no afectaron la permanencia del mini-implante (45)
El estudio de Oltramari-Navarro de minimplantes en cerdos, aplico 150 g en tres intervalos de tiempo diferentes: carga inmediata, después de 15 días y después de 30 días, los resultados histomorfométricos fueron similares para todos los grupos, con la oseointegración parcial de los mini-implantes, resaltando que no existía diferencia entre los diferentes periodos de aplicación de la carga (53)

Los resultados en esta investigación corroboran que la carga inmediata favorece el proceso de cicatrización del tejido circundante al Implante Ortodóntico (IO) ya que a partir del Día 6 inician los depósitos de Ca a ser evidentes sobre la superficie del IO y del tejido óseo en la muestra Experimental (lado Tensión) y Control; que a su vez desarrollaron un comportamiento similar durante los días evaluados como lo menciona Nilo y colaboradores (45), se encontró una formación de tejido óseo más maduro con presencia de osteocitos, en intimo contacto con el IO a partir del día 25 tanto en el lado de presión como en el lado de tensión, mientras en la muestra control se encontró una separación entre el tejido óseo y la superficie proximal del IO, lo cual indica una aceleración en el tiempo de oseointegración cuando el minimplante es cargado con una fuerza inmediata que se mantiene por más de 25 días.

14 CONCLUSIONES

- Es necesario continuar con estudios histológicos en cortes más delgados para poder realizar una descripción a nivel celular, ya que al examinar las muestras en microscopio se observó que el desgaste fue insuficiente, dificultando analizar la presencia de células y diferenciar el tipo celular al cual pertenecía cada una.

- La carga inmediata con fuerzas leves no afecta negativamente el patrón de cicatrización

- Una mayor fijación primaria fue evidente en la zona de presión de la muestra experimental durante los primeros 15 días (mayor zona de contacto hueso implante).

- Las fuerzas leves favorecen la fijación primaria inicial y permiten una fijación secundaria tempranamente en la zona de tensión (20 días)

- Se encontró evidencia de fijación secundaria en la superficie de tensión de la muestra experimental, con presencia de hueso maduro en contacto íntimo con el IO a partir del día 20.

- Los minimplantes bajo una tracción Ortodóntica inmediata 150gr evidencian un aumento progresivo de contacto hueso - IO siendo mayor en las muestras experimentales que en el control.

- El área de contacto hueso – implante para el lado de tensión de la muestra Experimental aumento en forma progresiva, superando al lado de presión del día 20 al 30.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Branemark P, Breine UA, R , Hansson O, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses I. Experimental studies. Scand J Plast Reconstr Surg. 1969; 3: p. 81 - 100.

2. Branemark P. Osseointegration and its experimental background. J. Prosthet Dent. 1983; 50(3): p. 399 - 410.

3. Schenk R, Buser D. Osseointegration: a reality. Periodontology 2000. 1998; 17: p. 22 - 35.

4. Branemark R, Branemark P, Rydevik B, Myers R. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation. A review. J. Rehab. Research Dev. 2011; 38(2): p. 175 - 181.

5. Adell R, B E, Lekholm U, Branemark P, Jemt T. Long-term follow up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. Int J Oral Maxillofac Implants. 1990; 5: p. 347 - 59.

6. Roberts E, Helm F, Marshall K, Gongloff R. Rigid endosseous implants for orthodontic and orthopedic anchorage. Angle Orthodontist. 1989; 59(4): p. 247 - 256.

7. Arcuri C, Muzzi F, Santini F, Barlattani A, Giancotti A. Five years of experienc e using palatal Mini-Implants for Orthodontic Anchorage. 2007; 65: p. 2492 - 2497.

8. Sandler J, Benson P, Doyle P, Majumder A, O'Dwyer J, Speight P, et al. Palatal implants are a good alternative to headgear: A randomized trial. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2008; 133: p. 51 - 7.

9. Yao C, Lai E, Chang J, Chen I, Chen Y. Comparison of treatment outcomes between skeletal anchorage and extraoral anchorage in adults with maxillary dentoalveolar protrusion. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2008 November; 134(5): p. 615 - 24.

10. Qiang Zhang LZYWHWZZZXea. The effect or varying healing times on orthodontic mini-implant stability: a microscopic computarized tomographic and biomechanical analysis. Surg Oral Med Pathol Oral radiol endod. 2011.

11. Antosewska J, Papadopulus M. Five-year experience with orthodontic miniscrew implants: A retrospective investigation of factors influencing success rates. 2009 August; 136(2): p. 158 e1- 158 e10.

12. Moon C, Lee D, Im J, Baek S. Factors associated with the success rate of orthodontic miniscrews placed in the upper and lower posterior buccal region. Angle Orthodontics. 2008; 78(1): p. 101- 6.

13. Buschang P, Mortensen M, Oliver D, Kyung HBR. Stability of immediately loaded 3- and 6- mm miniscrew implants in beagle dogs - a pilot study. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2009 August; 136(2): p. 251 - 9.

14. Kato M, Onari e, arisaea E, Da Silva N, Ramos A. Osseointegration features of orthopedic Ti-10Si-5B implants. Mater SciEngC MaterBiol Appl. 2009; 29: p. 980-986.

15. Casale M, Acosta J, Diaz MMF. Evaluacion histologica del comportamiento tisular a la carga inmediata de mini implantes ortodonticos de titanio. Estudio en Ratas Wistar SPF. Pontificia Universidad Javeriana, Posgrado de Cirugia Oral y Patologia. Facultad de Odontologia; 2009.

16. Casale M, Rivera P. Evaluacion Biomecanica e Histologica de Implantes Ortodonticos de Titanio cargados con diferentes Brazos de Palanca. Universidad Nacional de Colombia, Posgrado de Ortodoncia. Facultad de Odontologia; 2011.

17. Casale M, Saavedra M. Evaluacion del Comportamiento Tisular y Biomecanico a la Carga Inmediata y Tardia de Implantes Ortodonticos de Titanio. Universidad Nacional de Colombia., Posgrado de Ortodoncia. Facultad de Odontologia; 2011.

18. Casale M, Rodriguez T. Evaluación Histomorofométrica del proceso de cicatrización de Implantes Ortodónticos de Titanio. Tesis de Grado. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia., Departamento de Salud Oral.; 2012.

19. Vanegas J, Garzón D, Casale M. Interacción entre osteoblastos y superficies de titanio: aplicacion en implantes dentales. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2010; 29(1): p. 51-68.

20. Casale M, Melo J. Evaluación clínica, radiológica e histológica de mini implantes autoperforantes bajo carga ortodóntica y ortopédica inmediata con diferentes brazos de palanca (0mm, 4mm y 6mm). Tesis de grado. 2007.

21. Casale M, Melo J. Evaluacion Clinica, Radiologica e Histologica de Mini Implantes autoperforantes bajo carga ortodontica y ortopedica inmediata con diferentes brazos de palanca. Estudio Piloto. Universidad Nacional de Colombia, Posgrado de Ortodoncia. Facultad de Odontologia; 2008.

22. Vanegas J, Landinez N, Garzón A. Modelo matemático de la coagulación en la interfase hueso implante dental. revista cubana de Investigaciones biomédicas. 2009; 28(3): p. 167-191.

23. Luzi C, Verna C, Melsen B. Immediate loading of orthodontic mini-implants: a histomorphometric evaluation of tissue reaction. European j of Orthod. 2009;: p. 21-29.

24. Freire J, Silva N, Gil J, Magini r, Coelho P. Histomorphologic and histomophometric evaluation of inmediately andearly loaded mini-implants for orthodontic anchorage. am J Orthod Dentofacial Orhop. 2007;: p. 704-712.

25. Cooper L. Biologic determinants of bone formation for osseointegration: clues for future clinical improvements. J Prosthet Dent. 1998; 80: p. 439-449.

26. Huja S, Robert E. Mechanism of osseointegration: characterization of supporting bone with indentation testing and backscattered imaging. Semin Orthod. 2004; 10: p. 162-173.

27. Casale M, Acosta J, Diaz M, Moreno F. Evaluación histlógica del comportamiento tisular a la carga inmediata de mini implantes ortodónticos de Titanio. Pontificia Universidad Javeriana. 2009.

28. Martínez AEa. Análisis de líquuido sinovial. Reumatol clin. 2010; 6(6): p. 316-321.

29. Engquist B BTKTLU. A retrospective multicenter evaluation of osseointegrated implants supporting overdentures. Int J Oral Maxillofac Implants. 1988; 3(2): p. 129-34.

30. Triplett RG MMAWMJ. Endosseous cylinder implants in severely atrophic mandibles. Int J Oral Maxillofac Implants. 1991; 6(3): p. 264-9.

31. Jemt T LU. Implant treatment in edentulous maxillae: a 5-year follow- up report on patients with different degrees of jaw resorption. Int J Oral Maxillofac Implants. 1995; 10(3): p. 303-11.

32. Mellado Valero A FGJCCJLR. Tratamiento implantológico en el paciente con osteoporosis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010; 15(Ed. esp.): p. 45-50.

33. Jong-Wha , Jong-Wan Kim NKJHLTWK. Analysis of time to failure of orthodontic mini-implants after insertion or loading. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2015; 41(15).

34. Young-Kyun , Kim YJ, Yun PY, Kim. JW. Effects of the Taper Shape, Dual-Thread, and Length on the Mechanical Properties of Mini-implants. The Angle Orthodontics. 2009; 79(5): p. 908 – 914.

35. Jaffin A. R. LBC. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. J Periodontol 1991. ; 1: p. 2-4.

36. CE. M. Divisions of available bone in implant. Int J Oral Implantol. 1990; 7(1): p. 9-17.

37. Yan Chen HMKWTZWJY. Critical factors for the success of orthodontic mini-implants: A systematic review. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2009 March; 135(3): p. 284–291.

38. Woods P, Buschang P, Owens S, Rossouw P, Opperman L. The effect of force, timing and location on bone to implant contacto of miniscrew implants. Eur J Orthod. 2009. ; 31(3): p. 332-40.

39. Motoyoshi M, Hirabayashi M, Uemura M. Recomended placement torque when tigthtening an orthodontic mini - implant. Clinical Oral Implant Research. 2006 Feb; 17: p. 109 - 114.

40. Chen F, K T, K H, Study. SI. Anchorage Effects of a Palatal Osseointegrated Implant with Different Fixation: A Finite Element. The Angle Orthodontist. ; 75(4): p. 593 – 601.

41. Guerrero J, M C, Barbosa E, Garzon D. Determinación del proceso de remodelado óseo en procedimientos de inserción de Implantes y mini implantes dentales mediante el método de elementos finitos.. Congreso de Métodos Numéricos en Ingenieria. Lisboa. 2015 Junio.

42. Serra GMLECEa. sequentialbone healing of inmediately loadedmini-implants: histomorphometric andfluorescence analysis. Am j Orthod Dentofacial Orthop. 2010; 137: p. 80-90.

43. Serra G,ML,EC,MM,AL,Ea. Sequential bone healing of inmediatelyloadedmini-implants. Am J Orthod Dentofacial orthop. 2008; 134: p. 44-52.

44. Chen S,CH,CY,WYEa. Tissue reaction surrounding miniscrews for othodonticanchorage: an animal experiment. Journal of Dental Sciences. 2012; 7: p. 57-64.

45. Nilo J,FN,SJ,Ea. Hitomorphologic and histomorphometric evaluation of inmediately and early loaded mini-implants for orthodontic anchorage. Am J orthod Dentofacial Orthop. 2007; 131: p. 704.

46. Albrektsson T JC. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. Eur. Spine J. 2001; 10: p. 96-101.

47. J. D. Understanding peri-implant endosseous healing. Journal of dental education. 2003; 67(8): p. 932-49.

48. Vanegas J,LN,GD. Generalidadesdelainterfase hueso - implante dental. Revista cubana de investigacionesbiomédicas. 2009; 28: p. 130-146.

49. Andre´ Buchter DWCGMHMVHPWea. Load-related bone modelling at the interface of orthodontic micro-implants. Clin. Oral Impl. 2006; 17: p. 714–722.

50. Carano A LPVSea. Mechanical properties of three different commercially available miniscrews for skeletal anchorage. Prog Orthod. 2005; 6(82-97).

51. Christensen FB DMSFea. Titanium-alloy enhances bone-pedicle screw fixation: mechanical and histomorphometrical results of titanium-alloy versus stainless steel. Eur Spine J. 2000; 9(97-103).

52. Gritsch K LNBJMEPMLea8. In Vivo Evaluation of Immediately Loaded Stainless Steel and Titanium Orthodontic Screws in a Growing Bone. PLoS ONE. 2013 octubre; 8(10).

53. Paula V.P. Oltramari-Navarro RLNJFCHTnMCCEFJAMJea. The impact of healing time before loading on orthodontic mini-implant stability:A histomorphometric study in minipigs. Archives of oral biology. 2013 Julio; 58(7).