

**CAMBIOS TISULARES PRODUCIDOS POR LA IMPLANTACIÓN SUB-
CUTÁNEA DE MICROCHIPS RFID PASIVOS CON PARYLENE C® EN PIEL DE
RATA WISTAR**

SEBASTIÁN MEDINA CÁRDENAS



UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA
Santiago de Cali, 2016

**CAMBIOS TISULARES PRODUCIDOS POR LA IMPLANTACIÓN SUB-
CUTÁNEA DE MICROCHIPS RFID PASIVOS CON PARYLENE C® EN PIEL DE
RATA WISTAR**

SEBASTIÁN MEDINA CÁRDENAS

Trabajo de Investigación como requisito parcial para optar por el título de
Magíster en Ciencias Biomédicas

Directores:
FREDDY MORENO GÓMEZ Od., MSc.
CARLOS MEJÍA PAVONY Od., MSc.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA
Santiago de Cali, 2016

Nota de aceptación:

Presidente del Jurado

Jurado No. 1

Jurado No. 2

Jurado No. 3

Fecha de sustentación
(Ciudad, día, mes y año)

DEDICATORIA

A Cristian, que tuvo la paciencia para aceptarme en este proceso que vimos difícil de llevar a cabo hace casi cuatro años, y a Sunny y Aldemar, que desde algún lado de nuestra limitada concepción del más allá, siguen aportando positivamente a mi vida.

AGRADECIMIENTOS

La formación humana y sus diferentes ejes nos induce a que necesitemos de los demás para crecer y continuar soñando. La realización de este trabajo de investigación y mi formación como Magister fue posible por acciones directas de personas que motivaron día a día a nunca decaer en este camino.

Agradezco a mi familia, especial a mi hermano Cristian por permanecer constante en esos días que no eran tan buenos y él siempre me alentaba en nuestro hogar.

Agradezco a mi tutor Freddy Moreno, un maestro de invaluable capacidades, un profesional destacado, una persona de gran humanismo y mi ejemplo más cercano a seguir en el camino de la investigación y la docencia.

Agradezco a mis profesores Carlos Mejía, Adriana Jaramillo y Diego Vallejo, que con sus aportes individuales permitieron que este trabajo se nutriera constantemente y me dieron la oportunidad de seguir aprendiendo de ellos.

Agradezco al Grupo Teblami y sus líderes por la oportunidad de formarme profesionalmente en el campo de la Histología Humana y servir como mis iniciadores desde pregrado en el campo de la investigación en morfología, al cual le dedico parte de mi vida y mi pasión académica.

Agradezco a Norhita y Martha por su comprensión, regaños y compañía constante en el proceso de aprender y re-aprender en el laboratorio y ayudarnos en el salto desde el campo clínico al ambiente de laboratorio.

Agradezco al Departamento de Morfología y a la Universidad del Valle por el apoyo humano y financiero que hizo posible financiar este trabajo de investigación por medio de la Convocatoria Interna 2013-I y el compartir los avances del mismo en eventos regionales y nacionales donde se pudo obtener un reconocimiento por el anteproyecto de investigación.

Agradezco a los doctores y patólogos clínicos Nancy Vargas y Luis Escobar por su asesoría y acompañamiento en las descripciones de las muestras de este estudio.

Agradezco a mis amigos de pregrado, postgrado y de vida que nunca dudaron en brindarme sus oídos frente a mis quejas o desesperanza dentro de la maestría.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTOS	6
CONTENIDO	7
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABLAS	16
LISTA DE ANEXOS	18
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	19
SUMMARY AND KEY WORDS	21
 INTRODUCCIÓN	 23
 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	 25
Pregunta de investigación.	25
Justificación.	25
 1. MARCO TEÓRICO	 27
1.1. Reseña histórica de los sistemas de microchips RFID pasivos.	27
1.2. Microchip RFID pasivo.	30
1.3. Verychip.	33
1.4. Uso de los microchips RFID Pasivos.	35
1.4.1. Aplicaciones médicas.	35
1.4.2. Mecanismo de identificación forense.	36
1.5. Parylene C®.	38
1.6. Piel en mamíferos.	39
1.6.1. Epidermis.	41
1.6.2. Dermis y faneras o anexos	42
1.7. Lesiones tumorales asociadas a microchips de implantación subcutánea.	43
1.8. Respuesta Granulomatosa a Cuerpo Extraño Secundaria a biomateriales y formación del granuloma	45
1.8.1. Adsorción de proteínas.	46
1.8.2. Formación de la matriz provisional.	47
1.8.3. La respuesta inflamatoria aguda.	47
1.8.4. La respuesta inflamatoria crónica.	49
1.8.5. La formación del tejido de granulación.	49

1.8.6. La RGCE secundaria a biomateriales.	49
1.8.7. La formación de la cápsula fibrosa.	51
1.9. Neoplasias.	53
2. OBJETIVOS	55
2.1. Objetivo general.	55
2.2. Objetivos específicos.	55
3. MATERIALES Y MÉTODOS	56
3.1. Tipo de estudio.	56
3.2. Muestra.	56
3.2.1. Criterios de inclusión.	56
3.2.2. Criterios de exclusión.	57
3.2.3. Tamaño y distribución de la muestra.	57
3.3. Consideraciones éticas.	58
3.4. Trabajo de campo.	58
3.4.1. Fase I: Recepción de biomodelos e implantaciones.	59
3.4.1.1. Entrega de especímenes en el Bioterio y asignación a los grupos.	59
3.4.1.2. Procedimiento de implantación subcutáneo de Microchip RFID pasivo y cápsulas de vidrio.	59
3.4.1.3. Procedimiento punción subcutánea sin implantación.	61
3.4.1.4. Sedación para implantación y punción sin implantación.	61
3.4.1.5. Manejo de los biomodelos a partir de la entrega por parte del bioterio y asignación de los grupos	61
3.4.1.6. Sedación y eutanasia con medio inhalado.	63
3.4.2. Fase II: Procesamiento histoquímico de muestras de piel.	64
3.4.2.1. Biopsia del lugar de implantación (microchip y tejido peri-implantar), fijación y conservación de la muestra.	66
3.4.2.2. Procesamiento de las muestras para tinciones histoquímicas.	68
3.4.2.2.1. Deshidratación, aclaramiento, infiltración e inclusión.	68
3.4.2.2.2. Corte y montaje.	69
3.4.2.2.3. Tinciones y montaje.	69
3.4.3. Fase III: Análisis histopatológico descriptivo.	70
3.4.3.1. Observación y análisis histopatológico.	70
3.4.3.2. Toma de imágenes digitales.	71
3.4.3.2.1. Medición del grosor de cápsulas fibrosas	72
3.4.3.3. Análisis estadístico <i>a priori</i> .	72
3.4.3.4. Análisis estadístico <i>a posteriori</i> .	73

3.4.4. Codificación de variables.	73
4. RESULTADOS	75
4.1. Análisis univariado para la determinación de frecuencias relativas y absolutas para cada variable de estudio.	75
4.1.1. Unidades muestrales según el grupo de estudio y el tiempo de duración de la exposición/implantación.	75
4.1.2. Unidades muestrales según el grupo de estudio y el tipo de material de revestimiento.	76
4.1.3. Cambios en la piel de la rata Wistar	76
4.1.3.1. Cambios en la epidermis.	76
4.1.3.2. Cambios en la dermis.	77
4.1.3.3. Características del tejido adiposo presente en el tejido celular subcutáneo y presencia de inflamación intra-tisular.	79
4.1.3.4. Características histológicas del panículo carnososo.	80
4.1.4. Generación histológica de una cápsula fibrosa	81
4.1.4.1. Presencia o ausencia de una cápsula fibrosa derivada del proceso de implantación/punción en región subcutánea interescapular.	81
4.1.4.1.1. Medidas de grosor de las cápsulas fibrosas.	85
4.1.4.1.2. Estimación del promedio del grosor de las cápsulas fibrosas entre el universo y para cada uno de los grupos.	86
4.1.4.1.3. Determinación de las diferencias entre grupos a partir de la comprobación de los supuestos de normalidad y análisis de la variable grosor.	89
4.1.5. Generación de una RGCE secundaria a biomateriales y estadio inflamatorio	90
4.1.5.1. Presencia de signos celulares de inflamación pericapsular.	90
4.1.5.2. Tipo de infiltrado inflamatorio según densidad celular presente y tipo de células.	92
4.1.5.3. Evidencia de características histológicas compatibles a la formación de una RGCE secundaria a biomateriales.	93
4.1.5.4. Presencia de material extraño en región pericapsular y tipo de material observado.	96
4.2. Análisis bivariado para distribución de las variables dependientes de interés en relación a la variable independiente “grupo de experimentación”.	98
4.2.1. Cambios en la dermis entre los tres grupos de estudio.	98
4.2.2. Presencia de cápsula fibrosa e inflamación peri-capsular para los tres grupos de estudio.	98
4.2.3. Tipo de infiltrado inflamatorio según densidad celular presente para los tres grupos de estudio.	99

4.3. Análisis bivariado para distribución de las variables dependientes de interés en relación a la variable independiente “tiempo de implantación”.	100
4.3.1. Cambios en la dermis en función del tiempo de implantación.	100
4.3.2. Presencia de cápsula fibrosa en función del tiempo de implantación.	101
4.3.3. Presencia de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación.	102
4.3.4. Tipo de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación.	103
 5. DISCUSIÓN	 104
5.1. Biomodelo usado para evaluación de cambios tisulares frente a un dispositivo tipo Microchip RFID pasivo, fijación y lugar de implantación de los dispositivos implantados a nivel subcutáneo.	104
5.2. Formación de una RGCE secundaria a biomateriales.	108
5.3. Formación de una cápsula fibrosa como respuesta a la presencia de un elemento implantado y generación de un estadio inflamatorio crónico.	110
5.4. Generación de cambios neoplásicos.	113
 6. CONCLUSIONES	 114
 7. RECOMENDACIONES	 115
 8. BIBLIOGRAFÍA	 116
 9. ANEXOS	 123

LISTA DE ABREVIATURAS

I1: Intervención 1.

I2: Intervención 2.

CH: Control histológico.

GH: Gránulos de hemosiderina.

HE: Hematoxilina – Eosina.

TcrM: Tricrómica(o) de Masson.

MB: Material birrefringente.

MNG: Material negruzco granular.

Mic/Pary: Microchip región de Parylene C®.

Mic/Vi: Microchip región de vidrio.

RGCE: Respuesta granulomatosa a cuerpo extraño.

RFID: Radio Frequency Identification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema sistema funcionamiento microchip RFID pasivo VeriChip™

Figura 2. Esquema componentes de un microchip RFID pasivo VeriChip™.

Figura 3. Estructura de la información almacenada en el microchip RFID pasivo

Figura 4. Microchip RFID pasivo (*VeriChip*™). Nótese la funda de Parylene C® rodeando parcialmente la cápsula de vidrio hacia el extremo de la derecha.

Figura 5. Piel de rata Wistar con sus características de normalidad teñida con Hematoxilina – Eosina. A. Reconstrucción en el plano Y a 10X, observe la distribución de los componentes tisulares que conforman la piel. La representación del músculo hacia nivel basal es el panículo carnoso. B, D, E imágenes a 10X. C. Imagen a 40X, observe un folículo piloso y varias glándulas sebáceas alrededor.

Figura 6. Piel de rata Wistar con sus características de normalidad teñida con Tricrómica de Masson. A. . Reconstrucción en el plano Y a 10X, observe la distribución de los componentes tisulares que conforman la piel. La representación del músculo hacia nivel basal es el panículo carnoso.

Figura 7. Representación de la organización celular que conforman una RGCE secundaria a biomateriales. Extraído de López C *et al*(1)

Figura 8. Proceso de implantación subcutánea de microchip RFID pasivo en rata Wistar. El mismo procedimiento fue usado para la implantación de las cápsulas de vidrio y las punciones. Ubicado el modelo en posición decúbito prono (A), se inserta la punta de la jeringa-cánula, elevando la piel de la región interescapular y penetrando subcutáneamente 1cm y totalmente paralelo a la región dorsal, procediendo luego a posicionar el dispositivo con el embolo que tiene la jeringa-cánula (B, C, D).

Figura 9. Biopsia de biomodelo implantado con microchip RFID pasivo. Se puede observar la tricotomía realizada en la region dorsal-escapular (circulo negro) de la rata Wistar(A). Se observa el dispositivo implantado en posición (rectangulo negro) y el colgajo libre de piel que representa la biopsia obtenida (B, C).

Figura 10. Muestras de piel en post-fijación con formol buferado. Observe el defecto subcutáneo que queda en el sitio de implantación.

Figura 11. Características de la epidermis de una muestra correspondiente al grupo Intervención. Se observa que la epidermis conforma una capa de apariencia unilamelar pero que puede mostrar estratificación en algunos planos, constituyendo un típico epitelio plano estratificado queratinizado (Flechas). Todas las imágenes

son mostradas en la tinción de Hematoxilina – Eosina. Objetivo 10X: A; Objetivo 40X: B, C, D.

Figura 12. Se observan imágenes correspondientes a la dermis en las muestras de piel de rata Wistar teñidas con Hematoxilina Eosina. Por lo general se puede ver una mayor acidofilia que podría corresponder a un aumento en el componente fibrilar de la matriz extracelular correspondiente a la dermis reticular. En las regiones profundas se puede observar una menor intensidad de la tinción acidófila (Imágenes A y F). En algunas de las muestras se podía encontrar una pérdida de la aparente cohesión que hay del tejido conectivo denso irregular dérmico, durante la inclusión en el baño maria, todos los cortes correspondientes a los bloques parafinados del grupo Intervención, presentaron abombamiento y en algunos casos estallamiento, lo que hacía difícil su obtención y manejo (Imágenes C, E). Objetivo 10X: C, E; Objetivo 40X: A, B, D, F.

Figura 13. Recuadro comparativo entre grupos de estudio. Se muestra el contraste frente al patrón de normalidad (Imagen A) frente a los grupos control (imagen B) e intervención (imagen C). Se puede apreciar la discontinuidad y desarreglo de las regiones de dermis reticular que se da en los grupos control e intervención. Objetivo 10X: A, B, C.

Figura 14. Panículos adiposos como parte del tejido celular subcutáneo. Se muestra la extensión generalizada del tejido adiposo en el tejido celular subcutáneo (Imagen A) y la existencia de tejido adiposo pardo en la región interescapular (imagen B y C) No se observan infiltrados celulares que sugieran una respuesta inflamatoria de tipo agudo o crónico existente. Objetivo 4X: B; Objetivo 10X: A; Objetivo 10X: C.

Figura 15. Muestra de piel teñida con Hematoxilina-Eosina donde se observa presencia de estructura acidófila continua compatible con una cápsula fibrosa. Reconstrucción asistida con el módulo Image Buldier del programa LASV4.7. Flecha=Tejido peri-implantar. Objetivo 10X.

Figura 16. Muestra de piel teñida con Hematoxilina-Eosina donde se observa presencia de estructura acidófila continua compatible con una cápsula fibrosa, comparar el tejido que rodea a la cápsula fibrosa como varía en características entre muestras, esta es la región denominada tejido peri-implantar (flecha). Reconstrucción asistida con el módulo Image Buldier del programa LASV4.7. Objetivo 10X.

Figura 17. Se puede apreciar la alta celularidad infiltrada dentro de la cápsula fibrosa, con células compatibles a linfocitos. Se distingue por debajo de la cápsula, células fusiformes, separadas, compatibles con fibroblastos (flecha continua), e igualmente aparición de capilares en la región peri-implantar (flecha discontinua). Objetivos= 10X(Imagen A): 40X (Imagen B).

Figura 18. Muestra 3V6M. Se aprecia reconstrucción digital (Imagen A) con una región de interés con alta celularidad intra-capsular (recuadros en A y B). Se observa presencia de capilares intracapsulares y pericapsulares (flechas). Objetivo 10X: A y B; Objetivo 40X: C.

Figura 19. Muestra 11P6M teñida con la tinción Tricrómica de Masson. Reconstrucción asistida con el módulo Image Buldier del programa LASV4.7. Flecha=Tejido peri-implantar. Objetivo 10X. Flecha=Tejido peri-implantar. Objetivo 10X.

Figura 20. Comparación de tinción entre cápsula fibrosa teñida con Hematoxilina-Eosina (A) con una teñida con Tricrómica de Masson (B). Se observa que aumenta la intensidad del colorante dentro de la cápsula, esto podría indicar de la presencia de un colágeno fibrilar maduro. Objetivo 40X: A y B.

Figura 21. Hallazgos dentro de la cápsula fibrosa. Se puede observar el desarrollo de una capilarización intracapsular (Imagen A) y un aumento de la celularidad de la misma (Imagen B y C). Objetivos 40X: A, B, C.

Figura 22. Representación gráfica de promedio de grosor de cápsula para los grupos experimentales.

Figura 23. Representación gráfica de promedio de grosor de cápsula para todos los grupos de estudio.

Figura 24. Medición por medio de análisis de imágenes de cápsulas fibrosas asociadas a cuerpo extraño. Para las regiones en blanco intra-capsulares, se hacía la medición del espacio y se restaba a los límites visibles de la cápsula.

Figura 25. Se observa la diversa disposición de células con característica de infiltrados linfo-plasmocitarios en el tejido peri-implantar. Algunas de esas células rodean la vasculatura pericapsular (A y B) y se extienden en gran parte de esta región (C). El infiltrado inflamatorio puede tener disposición focal, nodular o difusa, generalizada, en las imágenes D y E se puede observar un infiltrado celular focalizado de aspecto nodular relacionado con la cápsula fibrosa (cuadro negro). Objetivo 10X: B, D; Objetivo 40X: A, C, E.

Figura 26. Células dentro de la región peri-implantar e intracapsular.

Figura 27. Respuesta granulomatosa muestra 6P4M. Observe a diferentes cortes como hay una organización celular periférica a un material birrefringente (Recuadro negro Imagen A, B, C), aparentemente particulado (Imagen D, Flecha continua roja Imagen E). Se pueden apreciar células multinucleadas con una disposición de núcleos en herradura compatible con Célula Gigante Multinucleada de cuerpo extraño (Flecha negra continua) e igualmente células con morfología tipo

epitelioide con núcleo en forma de media luna (flecha discontinua). Objetivo 40X: A, B, C: Objetivo 100X: D, E

Figura 28. Respuesta granulomatosa muestra 6V4. Se observa que el material central tiñe altamente eosinófilo y su organización difiere de estructuras similares como los folículos pilosos de este biomodelo.

Figura 29. Respuesta granulomatosa muestra 6P4M. Observe la alta celularidad en la banda acidófila que representa a la cápsula fibrosa y en su próxima se observan células con varios núcleos en disposición de herradura compatible con célula gigante multinucleada de cuerpo extraño (recuadro negro). Objetivo 40X: A, C. Objetivo 100X: B, D.

Figura 30. Presencia de células comparables a células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño dentro de la cápsula fibrosa de la muestra 6P4M.

Figura 31. Hallazgos de materiales pericapsulares. Se puede definir la presencia de gránulos de hemosiderina (flecha continua) en la región tisular peri-implantar, incluso se pueden encontrar depósitos intracapsulares. Observe igual la presencia de eosinófilos por dentro y fuera de la cápsula (Flecha discontinua).

Figura 32. Células compatibles morfológicamente con macrófagos con material negruzco granular citoplasmático. Se pueden observar en el tejido peri-implantar.

Figura 33. Muestra de piel correspondiente al grupo Intervención experimental. Observe que por debajo de la epidermis, el tejido conectivo de la dermis reticular pierde la cohesión regular observable en estas muestras (flechas).

Figura 34. Comparación entre una probable respuesta granulomatosa asociada a pelo (Imagen A) por la similitud morfológica con las células constitutivas de un folículo piloso y lo descrito en este trabajo como una posible RGCE secundaria a biomateriales (Imagen B). Objetivo: 40X en A y B.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Componentes y especificaciones técnicas de un microchip RFID pasivo (VeriChip™).
- Tabla 2.** Componentes y especificaciones técnicas de un escáner VeriChip Pocket Reader™.
- Tabla 3.** Piel y anexos
- Tabla 4.** Tipo de estudio
- Tabla 5.** Distribución de la muestra
- Tabla 6.** Manejo de la muestra luego del procedimiento de implantación
- Tabla 7.** Distribución de los biomodelos en las fases de estudio
- Tabla 8.** Categorización de las variables
- Tabla 9.** Distribución del n en los tres grupos de estudio definidos y en los grupos de tiempo definidos. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención
- Tabla 10.** Material de revestimiento según grupo de estudio. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención
- Tabla 11.** Estado morfológico de la epidermis
- Tabla 12.** Estado morfológico de la dermis
- Tabla 13.** Inflamación en tejido adiposo
- Tabla 14.** Determinación de la presencia o ausencia de una cápsula fibrosa
- Tabla 15.** Distribución por grupos de la aparición de una cápsula fibrosa. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención
- Tabla 16.** Mediciones de grosor de cápsula (μm) por muestra
- Tabla 17.** Promedio del grosor de las cápsulas fibrosas entre todos los sujetos con presencia de cápsula. Obs: Observados; DE: Desviación Estándar; Min: Mínimo; Max: Máximo
- Tabla 18.** Promedio del grosor de la cápsula fibrosa para los grupos de estudio y detalle por grupo. EE: Error Estándar; IC95%: Índice de confianza del 95%. **C:** Control; **I:** Intervención.
- Tabla 19.** Test de Shapiro Wilks
- Tabla 20.** Presencia o ausencia de inflamación peri-capsular
- Tabla 21.** Tipo de infiltrado inflamatorio
- Tabla 22.** Presencia o ausencia de RGCE secundaria a biomateriales
- Tabla 23.** Materiales extraños en región peri-capsular
- Tabla 24.** Cambios en la dermis entre los grupos de estudio. $p < 0.05$. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención
- Tabla 25.** Presencia de cápsula fibrosa e inflamación peri-capsular $p < 0.05$ **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención
- Tabla 26.** Tipo de inflamación según densidad celular para los tres grupos de estudio $p < 0.05$. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención; **CL:** Crónico Leve; **CM:** Crónico Moderado; **NA:** No aplica.
- Tabla 27.** Cambios en la dermis en función del tiempo de implantación (2 meses y 4 meses) para cada grupo de estudio. $p < 0.05$. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención
- Tabla 28.** Cambios en la dermis en función del tiempo de implantación (6 meses y

8 meses) para cada grupo de estudio. $p<0.05$. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención

Tabla 29. Presencia de cápsula fibrosa en función del tiempo de implantación (2 meses y 4 meses) para cada grupo de estudio. $p<0.05$. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención

Tabla 30. Presencia de cápsula fibrosa en función del tiempo de implantación (6 meses y 8 meses) para cada grupo de estudio. $p<0.05$. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención

Tabla 31. Presencia de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación (2 meses y 4 meses) para cada grupo de estudio. $p<0.05$. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención

Tabla 32. Presencia de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación (6 meses y 8 meses) para cada grupo de estudio. $p<0.05$. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención

Tabla 33. Tipo de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación (2 meses y 4 meses) para cada grupo de estudio. $p<0.05$. **C:** Control; **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención; **CL:** Crónico Leve; **CM:** Crónico Moderado; **NA:** No aplica.

Tabla 34. Tipo de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación (6 meses y 8 meses) para cada grupo de estudio. $p<0.05$. **CH:** Control Histológico; **I:** Intervención; **CL:** Crónico Leve; **CM:** Crónico Moderado; **NA:** No aplica.

LISTA DE ANEXOS

- 9.1.** Descripciones histopatológicas
- 9.2.** Procedimientos Operacionales Estandarizados (POEs)
 - 9.2.1.** Protocolo de implantación de microchip
 - 9.2.2.** Protocolo de implantación cápsula
 - 9.2.3.** Protocolo de punción sin implantación
 - 9.2.4.** Protocolo de verificación de lectura de microchip RFID pasivos
 - 9.2.5.** Protocolo de eutanasia de biomodelos
 - 9.2.6.** Protocolo de obtención de biopsia
 - 9.2.7.** Protocolo de fijación de biopsia
 - 9.2.8.** Protocolo de procesamiento histoquímico de las muestras de piel
 - 9.2.9.** Protocolo de tinción para hematoxilina eosina
 - 9.2.10** Protocolo de tinción para tricrómica de Masson
 - 9.2.11.** Protocolo de toma de imágenes digitales de piel
 - 9.2.12.** Protocolo de mediciones para grosor de cápsula fibrosa
- 9.3.** Base de datos biomodelos
- 9.4.** Formato para información inicial del biomodelo y registro de novedades
- 9.5.** Aval de comité de ética animal

RESUMEN

Introducción: Con el tiempo, la tecnología RFID (Radio Frequency IDentification) ha evolucionado paulatinamente en cuanto a sus aplicaciones e inserción en las actividades del ser humano, siendo totalmente versátil en cuanto a tamaño, presentaciones y composición por lo que hoy se cuenta con sistemas de microchips RFID pasivos de implantación subcutánea que han sustituido progresivamente otros tipos de sistema de identificación humana o animal. El diseño de esta tecnología implantable ha requerido que se usen revestimientos biocompatibles, específicamente polímeros como el Parylene-C® que si bien, ha mostrado eficiencia biológica *in vitro* e *in vivo*, su interacción prolongada a nivel celular y tisular sigue incierta por lo que eventos como respuesta a cuerpo extraño e incluso neoplasias benignas o malignas asociados a la implantación de microchips, continúa con escasa investigación.

Objetivo: Describir los cambios tisulares producidos por la implantación subcutánea de un microchip RFID pasivo en rata Wistar a partir del análisis de los cambios histológicos en el tejido conectivo peri-implantar, la epidermis adyacente y las estructuras anexas.

Materiales y métodos: Ésta es una investigación experimental de tipo descriptivo-analítico de corte longitudinal en la cual se usaron 28 ratas Wistar como biomodelos de estudio distribuidos en tres grupos: un grupo de intervención 1 (implantación subcutánea de microchips RFID pasivo recubiertos parcialmente por un biopolímero comercial), un grupo de intervención 2 (implantación de una cápsula de vidrio sin ningún tipo de recubrimiento) y un grupo de control histológico (biomodelos que se sometieron al proceso quirúrgico sin implantación) a los cuales se les hicieron biopsias del implante y el tejido peri-implantar en diferentes tiempos para describir de forma longitudinal los cambios histológicos a través de placas histológicas teñidas con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson. La unidad de análisis fueron 40 bloques parafinados. El análisis estadístico se definió haciendo el análisis univariado donde se determinó para las variables cuantitativas sus medidas de tendencia central y dispersión, como el promedio y la desviación estándar. El análisis bivariado se hizo teniendo en cuenta la variable “Tiempo de implantación” y la variable “Grupo de estudio” por medio del test exacto de Fisher. En la variable “grosor de cápsula fibrosa” se utilizó la prueba de Shapiro Wilks para determinar el cumplimiento de los principios de normalidad y posterior, se usaron los test de Mann Whitney y Kruskal Wallis. Se definió que existirían diferencias estadísticas a un valor $p < 0.05$.

Resultados: Se encontró la formación de cápsula fibrosa en los grupos intervención y control en la mayoría de biomodelos, dándose diferencias estadísticamente significativas entre la aparición de la cápsula fibrosa, la aparición de inflamación y el tipo de inflamación presente. Se desarrolló una RGCE secundaria a biomateriales en cuatro biomodelos pertenecientes al grupo intervención y la aparición de

eventuales células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño, infiltrados linfoplasmocitarios, macrófagos y presencia de polimorfonucleares.

Conclusiones: Se acepta la hipótesis nula de que no se pueden observar cambios histológicos que constituyan un factor de riesgo la generación de respuestas granulomatosas de tipo cuerpo extraño secundarias a un biomaterial, sea este el vidrio o el Parylene C® como polímero de revestimiento, debido a que los hallazgos que se encontraron no tuvieron una significancia estadística. Esto hace entender que la implantación de microchips RFID pasivos es plausible desde el punto de vista biológico.

PALABRAS CLAVE: Microchip RFID pasivo, Parylene C®, implantación subcutánea, rata Wistar, respuesta a cuerpo extraño, piel.

SUMMARY

Introduction: Over time, RFID technology has gradually evolved in their applications and integration into the activities of the human being, being totally versatile in size, presentation and composition, so now, we have systems of subcutaneous implantation passive RFID microchips what they have gradually replaced other human or animal system identification. The design of this technology has required use of implantable biocompatible coatings, specifically polymers such as Parylene C® that while has shown in vitro and in vivo biological efficiency, its prolonged cellular and tissue level interaction remains uncertain, so events in response to foreign body and even benign or malignant neoplasms associated with microchipping, continues with little research.

Objective: Describe the tissular changes induced by subcutaneous implantation of a pasive RFID microchip in Wistar rat from the analysis of histological changes in the peri-implant connective tissue, the adjacent epidermis and adnexal structures

Materials and methods: This is an experimental research of descriptive-analytical type, in which 28 Wistar rats biomodels were used and divided into three groups: a control group (implantation of a glass capsule without any coating), an intervention group (subcutaneous microchipping passive RFID partially covered by a commercial biopolymer) and a group of histological controls (biomodels who underwent the surgical procedure without implantation) to which were biopsied implant and the peri-implant at different times to describe the histological changes through histological slides stained with hematoxylin-eosin and Masson trichrome. The unit of analysis was 40 paraffin blocks. Statistical analysis was defined by univariate analysis where their measures of central tendency and dispersion, as the mean and standard deviation was determined for quantitative variables. The bivariate analysis was done taking into account the variable "time implementation" and the variable "study group" by the Fisher exact test. Shapiro Wilks test was used in the variable "thickness of fibrous capsule" to determine compliance with the principles of normality and later, Mann Whitney and Kruskal Wallis were used. It defined statistical differences that exist at a $p < 0.05$ value.

Results: The formation of fibrous capsule in the intervention and control groups in most biomodels was found, giving statistically significant difference for the appearance of the fibrous capsule, the appearance of inflammation and type of inflammation present. a secondary Foreign Body Granulomatous Response to biomaterials was found in four biomodels belonging to the intervention group, like the appearance of giant cells any foreign body, lympho-plasmocitarios infiltrates, macrophages and polymorphonuclear presence.

Conclusions: The null hypothesis that can not be observed histologic changes that constitute a risk factor for the generation a secondary Foreign Body Granulomatous

Response to biomaterials is accepted, be it glass or Parylene C® as a polymer coating or the development of malignancies associated with peri-implant connective tissue, because the findings that were found had no statistical significance. This makes understand that the implementation of passive RFID microchips is plausible from the biological point of view.

KEY WORDS: Passive RFID microchip, Parylene C®, subcutaneous implantation, Wistar rat, foreign body response, skin.

.

INTRODUCCIÓN

La industrialización, los avances tecnológicos acelerados, la globalización y otros aspectos del postmodernismo, han llevado a que el hombre interactúe con su entorno de una forma diferente. La constante modernización de las actividades básicas del hombre lleva consigo una inserción drástica de la tecnología que evoluciona en pro de la eficiencia y eficacia en el contexto donde dicha tecnología sea usada, siendo de gran relevancia en la administración de la información y la identificación personal e individual. En cuanto a lo último mencionado, la identificación se constituye como una acción que permite clasificar y ordenar una serie de elementos en conjuntos definidos que pueden ser desagrupados de acuerdo a criterios únicos que se empleen en el proceso de identificación, por lo cual se constituye en una herramienta útil para todos los aspectos de la vida cotidiana; los métodos convencionales de identificación o administración de la información (tarjetas plásticas de banda magnética o código de barras, documentación física, etc.) progresivamente están siendo sustituidos por medios más rápidos, cómodos y fiables como los códigos QR, los chips y los sistemas NQS que emplean una tecnología denominada RFID (Radio Frequency IDentification).

Con el tiempo, la tecnología RFID ha tenido grandes cambios en cuanto a sus aplicaciones en la vida del ser humano, sus usos se remontan a la Segunda Guerra Mundial y desde entonces ha venido empleando en diversos contextos relacionados con fines de monitoreo, control e identificación de equipos, maquinaria y herramientas; monitoreo e identificación de animales domésticos, ganado y fauna salvaje; operatividad de edificios inteligentes; manejo y control de armamento; codificación y registro de productos de consumo; manejo y control de operaciones financieras, y por supuesto monitoreo e identificación de seres humanos.

Esta tecnología es totalmente versátil en cuanto a tamaño, formas, utilidades y costos por lo que hoy se tienen sistemas de microchips RFID de implantación subcutánea compuestos por una cápsula de vidrio y un revestimiento parcial de algún polímero biocompatible, encontrándose referenciado el uso de uno en particular, el Parylene C. Este biopolímero es usado buscando una retención física del microchip implantado que evite el desplazamiento del dispositivo a otras zonas del cuerpo y también para que sea fácil su ubicación al momento de escanearlo o controlar su estado clínico, además, se justifica su aplicación por la biocompatibilidad que ha demostrado en algunos tipos de dispositivos biomédicos como recubrimiento en prótesis valvulares, stends, entre otros(2–5).

A pesar de que estos materiales han mostrado eficiencia biológica *in vitro* e *in vivo*(5), la interacción prolongada de estos con los diversos tejidos de la piel, específicamente con el tejido conectivo de la dermis, permanece sin ser ampliamente estudiada y los hallazgos histopatológicos se han reducido a eventos casuales que no hacen parte de objetivos concretos de investigación(6,7).

Las respuestas adversas a dispositivos biomédicos implantados por vía subcutánea y recubiertos parcialmente por polímeros pueden desencadenar diversas reacciones tisulares por parte del huésped: inflamación local, dolor agudo, dolor crónico, problemas en la resolución de la cicatrización de la herida, respuestas a cuerpo extraño, fibrosis en la región peri-implantar y desarrollo de tumores asociados al cuerpo implantado(8–10).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y el creciente uso de los Microchips RFID pasivos de implantación subcutánea destinados a fines clínicos, el propósito de esta investigación fue describir los cambios tisulares que se produjeron debido a la implantación subcutánea de un microchip RFID pasivo recubierto con Parylene c® en rata Wistar.

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Pregunta de investigación

¿Cuáles son los cambios tisulares producidos por la implantación subcutánea de un microchip RFID pasivo recubierto con Parylene C® en la piel de la rata Wistar?

Justificación

Desde el 2004, la FDA (*Food and Drugs Administration*) aprobó la implantación subcutánea de microchips RFID pasivos en seres humanos tras determinar que no generan ningún impacto negativo en detrimento de la salud humana(11,12); sin embargo, la investigación en animales y algunos reportes aislados de casos en humanos, han manifestado que se pueden generar reacciones alérgicas, infecciones por mala asepsia durante el procedimientos de implantación, infecciones por mal cuidado durante el post-operatorio, lesiones tumorales y migración del microchip de manera subcutánea desde el sitio de implantación, lo cual ha sido asociado específicamente al recubrimiento parcial de un biopolímero genérico llamado *Parylene C*; además de estimada la posibilidad de deterioro y mal funcionamiento del microchip luego de implantado. Anexo a esto, gran parte de los resultados de investigación que señalan reacciones adversas al uso de microchips RFID en humanos o animales, se derivan de hallazgos sin ser objetivos concretos de investigación, como es el caso del uso de microchips de identificación en diversas especies animales, que se encuentran como población experimental de un estudio y enferman o mueren por causas agudas o crónicas relacionadas a la implantación del dispositivo en mención(2–4,7).

Pese a todo lo anterior, el uso de estos dispositivos se ha masificado dada su aplicación versátil en áreas del conocimiento que van desde la salud pública (implantación de microchips RFID pasivos en pacientes con compromisos sistémicos graves -enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, etc.- que requieran en cualquier atención acceder a la historia clínica completa), el clima organizacional de los recursos humanos de grandes empresas (implantación de microchips RFID pasivos para controlar horarios de entrada y salida, accesos restringidos a determinadas áreas, etc.) y el establecimiento de la identidad (implantación de microchips RFID pasivos con fines de identificación forense para el caso de miembros de las fuerzas armadas, personal en riesgo como miembros de la Cruz Roja, equipos de atención de desastres, etc.)(13–16).

Es por ello, que ante la posibilidad de implantación subcutánea de microchips RFID pasivos en humanos, la falta de investigación básica aplicada, la carencia de protocolos adecuados de investigación en modelos animales para este fin y la escasa evidencia científica que permita correlacionar el desarrollo de lesiones benignas y malignas asociadas a la implantación subcutánea, se hace necesario

diseñar estudios que permitan fundamentar el uso adecuado y pertinente de estos microchips en seres humanos, generando nuevo conocimiento que aporte evidencia científica sobre la posibilidad de desarrollar lesiones benignas de curso agudo o crónico e incluso, lesiones tumorales asociadas al área peri-implantar, que sean desarrolladas a partir de cualquiera de los tejidos que encontramos a este nivel en la piel.

Por tanto, esta investigación pretende describir los cambios tisulares producidos por la implantación subcutánea de un microchip RFID pasivo en ratas Wistar, a partir del análisis de los cambios histológicos en el tejido subcutáneo usando microscopía óptica de luz convencional, con las tinciones hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson, en diferentes intervalos de tiempo de exposición y contrastando los diferentes tipos de material de superficie (Superficie de Parylene C® y superficie de vidrio).

De acuerdo con la revisión de la literatura, existe controversia sobre la afirmación que los microchips RFID pasivos de implantación subcutánea son agentes causales de lesiones tumorales o lesiones crónicas agudas como reacciones granulomatosas de tipo cuerpo extraño secundaria a biomateriales y en caso de serlo, no hay información sobre el tiempo en que dichas lesiones se puedan desarrollar desde el momento de la implantación; por tanto, la hipótesis nula de este estudio es que durante la implantación subcutánea de un microchip RFID pasivo en ratas Wistar no se observan cambios histológicos que constituyan un factor de riesgo para el desarrollo de respuestas granulomatosas de tipo cuerpo extraño secundarias a un biomaterial, sea este el vidrio o el Parylene C ® como polímero de revestimiento o la generación de neoplasias asociadas al tejido conectivo peri-implantar.

Para fundamentar los cambios a describir, se realizó una revisión sistemática de la literatura, en inglés a través de PubMed, ScienceDirect y Hinari, a partir de descriptores en salud localizados en el MeSH (*Medical Subject Headings*) como “*passive RFID microchip*”, “*Parylene C®*”, “*subdermal implantation*”, “*subcutaneous implantation*”, “*Foreign body reaction/response*”, “*Wistar rat*”, y “*tumors of connective tissue*”; del mismo, en español a través de SciELO (*Scientific electronic library online*), a partir de descriptores en salud localizados en el DeCS (Descriptores en Ciencias de la Salud) en la BVS (Biblioteca Virtual en Salud) como “microchip RFID pasivo”, “Parylene C®”, “implantación subdérmica”, “implantación subcutánea”, “Respuesta/reacción a cuerpo extraño”, “rata Wistar”, y “lesiones tumorales de tejido conectivo”. Del mismo modo, se emplearon los descriptores para búsqueda en *Google Scholar*.

Se planteó como hipótesis alterna que sí se pueden observar cambios histológicos que constituyan un factor de riesgo la generación de respuestas granulomatosas de tipo cuerpo extraño secundarias a un biomaterial, sea este el vidrio o el Parylene C ® como polímero de revestimiento o para el desarrollo de neoplasias asociadas al tejido conectivo peri-implantar.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Reseña histórica de los sistemas de microchips RFID pasivo

El origen de la tecnología de identificación de radio frecuencia RFID (*Radio Frequency Identification*), el cual consiste en un método de almacenamiento y recuperación de datos remoto que usa dispositivos denominados etiquetas o “tags”, se remonta al marco técnico-científico de la Segunda Guerra Mundial (L. Theremin en 1946 y H. Stockman en 1948), durante la cual las naciones que conformaron el Eje y los Aliados emplearon el radar para detectar la posición de aviones, barcos, submarinos y tanques, sin embargo, este sistema no permitía reconocer a que bando pertenecían cada uno de ellos. Ante esta problemática, serían los alemanes los que descubrirían que, por ejemplo, al girar el avión en vuelo se generaba una señal específica en el radar, lo cual se constituyó en el primer sistema de RFID pasivo. No obstante fueron los ingleses, de la mano del creador del radar, el físico R.A. Watson-Watt, los que desarrollarían en 1938 el sistema IFF (*“Identification, Friend or Foe”*), el cual consistía en un transmisor o “transponder” (*TRANSmitter/resPONDER*) instalado en los aviones británicos el cual enviaba una señal activada cada vez que volaran a cierta distancia de los radares en tierra (sistema pasivo) o enviaban transmisiones constantes a varias millas de la posición de dichos radares (sistema activo), por lo que los aviones propios podían ser detectados sin riesgo de ser derribados. Posteriormente este sistema fue aplicado a los vehículos marinos, submarinos y terrestres, e inclusive dejó de ser de uso exclusivo de las fuerzas militares, para emplearse en la seguridad de automóviles y maquinaria de trabajo en caso de robo (17,18).

En los años 60 del siglo pasado, diferentes investigadores sentaron las bases del futuro de los RFID y su aplicación comercial. R.F. Harrington (1963); R. Richardson (1963) impulsó los dispositivos activados de manera remota a través de frecuencias de radio; J.P. Vinding (1968) aplicó los conocimientos de la época a un sistema de identificación mediante las funciones “pregunta/respuesta”; J.H. Vogelmann (1968); y O. Rittenback (1969) estudió las comunicaciones mediante mecanismos de radar(17).

En 1970 los diseñadores, inventores, compañías privadas, instituciones académicas y laboratorios gubernamentales se encontraban trabajando activamente en la tecnología RFID, como es el caso del Laboratorio Científico “Los Alamos” de la Universidad del Noreste de los Estados Unidos (M. Cardullo en 1973 patentaría el antecesor del microchip RFID como lo conocemos hoy en día, un *transponder* pasivo con memoria) y la Fundación *Microwave* en Suecia, cuya investigación evidenció notables adelantos en el campo de la telemetría y la identificación electrónica modulada. Posteriormente empresas como la *RCA* y la *General Electric* se encontraban investigando en diferentes sistemas de identificación electrónica(17).

Con el paso del tiempo se amplió el espectro de frecuencia (de 125 kHz a 13.56 MHz) alta lo cual permitió la aplicación de la tecnología RFID a un sin número de actividades versátiles como mandos de acceso, sistemas de pago y el empleo de tarjetas inteligentes, que permiten entre otras cosas colocar en vehículo en movimiento con la función de seguridad, mediante la implementación del EAS (*Electronic Article Surveillance*), sistema que se convertiría en la etiqueta electrónica o microchip de mayor uso en la actualidad por su bajo costo y eficacia, cuya función era indicar la presencia o ausencia de un objeto(18).

La empresa *Texas Instruments* implementaría el sistema *Tiris* antirrobo mediante el cual una tarjeta electrónica permite colocar en marcha un automóvil. Ya en el campo enteramente civil, las primeras patentes de RFID consistieron en transmisores que abrían puertas permitiendo el acceso a determinada área únicamente a personal autorizado el cual contaba con el transmisor. El gobierno de los Estados Unidos aplicó la tecnología en el sector energético para rastrear materiales nucleares, el sector del transporte, implementando peajes automatizados en caminos, puentes y túneles alrededor del mundo, y en el sector ganadero empleando microchips encapsulados en vidrio de implantación intra-dérmica para rastrear e identificar ganado(19,20).

De igual forma en Europa, la nueva tecnología encontró gran aceptación y su desarrollo se llevó a cabo por empresas como *Microdesign*, *CGA*, *Alcatel*, *Bosch* and the *Philips spinoffs of Combitech*, *Baumer* y *Tagmaster* entre otras(17).

Para 1990 la señal de radio frecuencia fue ampliada al sistema UHF (*Ultra High Frequency*) lo cual amplió la capacidad de lectura a un rango igualmente mayor, pero debido a los costos de la tecnología y a la falta de reglamentación, solo entró en vigencia entre 1999 y 2003 cuando se diseñaron las etiquetas inteligentes avaladas por el *Uniform Code Council* en el 2002, las cuales fueron empleadas para identificar y rastrear diferentes productos a través de la cadena de producción, suministro y venta mediante un número de serie electrónico el cual sería accesible por la Internet(21).

A partir de este momento la patente fue adquirida por diferentes laboratorios de investigación (*The Gillette Company*, *Procter & Gamble*, *Wal-Mart*, *Hewlett-Packard*, *Johnson & Johnson*, *Checkpoint Systems* y *Auto-ID Labs* entre otros) en Australia, Reino Unido, Suiza, Japón y China, los cuales unificaron los protocolos de la interfase, el Código del Producto Electrónico (EPC - *Electronic Product Code*) y el diseño de la red de lectura asociada a la Internet. Para el futuro próximo, la FCC (*Federal Communications Commission*) augura que la frecuencia alcanzaría los 5.9 GHz, lo cual ampliará exponencialmente la lectura remota de los microchips(17).

Si bien es cierto que durante los primeros años de éxito la aplicación de la RFID fue enteramente comercial, para el 2002 la tecnología permeó el campo de la salud, en

donde empresas como *VeriChip Corporation* implementaron una serie de *transponders* pasivos solo de lectura reconocidos como *VeriChip™*, los cuales son implantados de manera sub-cutánea en seres humanos con fines médicos como la identificación de pacientes y lectura de la historia clínica(22).

Estos microchips se empezaron implantar en humanos partir del 2004, dos años después de que la FDA (*Food and Drugs Administration*) aprobó su empleo tras determinar que no generaban ningún impacto negativo en detrimento de la salud humana, a pesar de que le han sido asociadas reacciones alérgicas, infección por mala asepsia al momento de la implantación o durante el post-operatorio y migración del microchip de manera sub-cutánea desde el sitio de implantación, y estimada la posibilidad de deterioro y mal funcionamiento luego de implantado(11).

La acogida mundial de esta tecnología es tal, que actualmente los RFID son empleados en casi todas las actividades con fines de monitoreo, control e identificación de equipos, maquinaria y herramientas; monitoreo e identificación de animales domésticos, ganado y fauna salvaje; operatividad de edificios inteligentes; manejo y control de armamento; codificación y registro de productos de consumo; manejo y control de operaciones financieras, y por supuesto monitoreo e identificación de seres humanos(12,14,20,21,23–26).

Actualmente este sistema de identificación por radio frecuencia consiste en un microchip RFID o *tag*, un lector o escáner y una base de datos almacenada en un computador, la cual puede ser accedida a través de la Internet. El empleo de este sistema incrementa la eficiencia y productividad de un proceso, haciendo más versátil la identificación, conteo, rastreo y clasificación del cualquier elemento, lo cual optimiza la recolección de datos e identificación de todo tipo de productos, disminuye errores y el desperdicio de recursos, mejora la administración de información, reduce costos operativos y de producción, incrementa el control de calidad, mejora la calidad del servicio al cliente. Con base a estos beneficios, el sistema se emplea en la actualidad en identificación de contenedores, inventarios dinámicos, control de transporte público y auto-tanques, gestión en líneas de producción, autenticación de marcas, reconocimiento automático de consumidores, protección antirrobo de vehículos, librerías, control de combustible y de llantas, y la identificación de animales e inclusive de seres humanos entre otros. Estas últimas con una amplia aplicación en los sectores comerciales y de la salud; inclusive, en la literatura ya existen reportes de identificación de individuos que han fallecido durante el concurso de grandes desastres como el tsunami ocurrido en Asia en el 2004, en donde una víctima fue identificada mediante la lectura de un microchip implantado de manera sub-cutánea(14).

1.2. Microchip RFID pasivos

Los microchips, etiquetas electrónicas, RFID *tags* o *transponders* de identificación electrónicos pasivos consisten en un artefacto de resonancia eléctrica conformado por un circuito de condensadores, una antena de recepción y transmisión, y un microchip electrónico, el cual, al entrar en contacto a través de la antena a una distancia de unos 10 cm aproximadamente con un campo electromagnético específico de baja potencia y amplitud modulada (AM) generado por el escáner, se alimenta con el voltaje inducido en la resonancia (de una frecuencia que va desde 125 kHz hasta la banda ISM -*Industrial Scientific and Medical*- de 2.4 GHz, e incluso más), para que este envíe el código único de identificación al mismo escáner, una vez allí, el código se amplifica y se convierte en formato digital, de esta forma se descifra y se presenta el número único de identificación en la pantalla LCD del escáner (Figura 1).

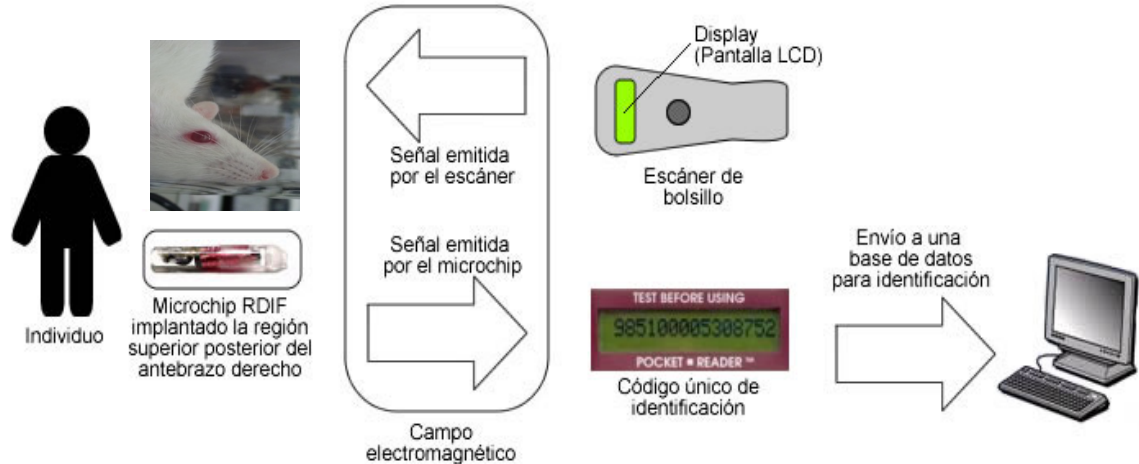


Figura 1. Esquema sistema funcionamiento microchip RFID pasivo VeriChip™

El *tag* consiste en el microchip en sí, el cual almacena un código de identificación de 16 dígitos, grabado en la superficie de forma inalterable con láser antes de su ensamble; la antena, muy simple, es una bobina de alambre de cobre alrededor de un núcleo de ferrita o de una base de hierro, que se encarga de recibir y transmitir desde y hacia el lector las diferentes señales; y el condensador recibe del escáner el voltaje necesario para permitir del microchip se active y emita el código de identificación (Figura 2).

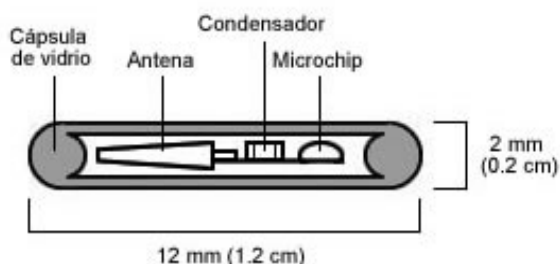


Figura 2. Esquema componentes de un microchip RFID pasivo VeriChip™.

Estos microchips, de acuerdo a la aplicación, se fabrican en diferentes presentaciones variando desde una etiqueta inteligente adhesiva empleada para marcar productos de consumo, hasta una cápsula biocompatible de vidrio constituida por cristal de cal de soda (USP tipo III) de 12 mm de longitud que se implanta de manera subcutánea en animales y seres humanos.

Al ser implantado de manera subcutánea, la cápsula de vidrio es recubierta en un extremo por una envoltura de 50 micras confeccionada de un polímero poroso de polipropileno inerte (*Parylene C®*, *Bio-Bond®*) que es similar al látex y que es utilizado para la fabricación de prótesis y partes de los marcapasos cardiacos, por lo que no existe rechazo por parte del organismo y que en este caso facilita la fijación al tejido al promover el desarrollo de fibroblastos y fibras de colágeno alrededor del implante, ya que al ser inyectado bajo la piel, el organismo lo reconoce y forma una delgada capa de proteína que lo fija en el sitio de implantación evitando de esta manera el desplazamiento o migración del microchip(27).

Los microchips RFID se pueden clasificar de acuerdo a la capacidad de almacenamiento de información, dentro de los cuales se encuentran los *transponder* de autenticación, que guardan un código serial predefinido e inalterable, empleados principalmente para identificar animales domésticos; los *transponder multipage*, que permiten agregar información adicional diferente del código serial, de amplio uso en los sectores agro-industrial y médico (implantado en un paciente puede suministrar aspectos de la historia clínica en caso de ser necesario); y los *transponders* del tipo sensor, de mayor objeto de investigación en la actualidad, que informan continuamente el funcionamiento fisiológico de un ser vivo como temperatura, concentración de metabolitos, hormonas y fármacos, presión arterial, etc.

También se pueden clasificar de acuerdo al ancho de banda, siendo los de frecuencia baja (100-500 kHz) empleados para abrir puertas, identificación animal, control de inventarios, inmovilización de automóviles, etc. Debido a su corto y medio rango de lectura por parte del escáner; los de frecuencia intermedia (10-15 MHz) de igual aplicación que el anterior pero con una velocidad de lectura un tanto mayor; y los de frecuencia alta (850-950 MHz y 2.4-5.8 GHz) de amplio rango y mayor

velocidad de lectura, aplicados comercialmente en monitoreo de vehículos principalmente.

De igual forma, los microchips RFID pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de la fuente de poder, en pasivos (empleados principalmente en seres vivos) cuando la energía requerida para su activación proviene del lector o escáner y es transmitida a través de la antena y, activos cuando la fuente de energía la posee el microchip; estas últimas son de mayor tamaño y se emplean en sensores de impacto, presión, posición, presión, temperatura, radiación, etc.

Otro tipo de clasificación se basa en las características de la memoria, esto es, los *transponders* de solo de lectura y los *transponders* de lectura y escritura, estos últimos con mayor capacidad de almacenaje(18,21,22,24).

En la actualidad, en el mercado se pueden encontrar diferentes marcas comerciales de microchips RFID pasivos de implantación sub-cutánea y de uso veterinario como *Avid®* (*American Veterinary Identification Devices*), *Allflex®*, *Destron Fearing®* (*Destron-Fearing Company*), *Identi-Pet®*, *InfoPET®* (*Biomark Inc*), *EasyTrac-ID®*, entre otros regulados por una serie de normas ISO; y solo uno de uso en seres humanos *VeriChip™* (*VeriChip® Corporation*) aprobado por la FDA (aprobación clase II - controles especiales)(11).

La manufactura de los diferentes microchips RFID pasivos implantados en seres vivos cuentan con regulación de la *International Standard Organization* reconocidas como la normatividad ISO(28). Es así como los microchips cuentan con 128 bits de capacidad de información distribuida de acuerdo a la Norma ISO 11784:1996(29) (Figura 3), 11 bits iniciales no reproducibles empleados para la sincronización del lector y del microchip. 64 bits que constituyen el código o número único de identificación; distribuidos en 38 bits para el código de cada país (el cual se encuentra regulado por la norma ISO 3166: 1993 y que para el caso de Colombia sería el A2: co, el A3: col y el número: 170), 10 bits para la identificación electrónica de cada fabricante del microchip, 1 bit denominado *Data Block* empleado para conocer si existen datos adicionales, 14 bits disponibles para implementaciones futuras y extensión de información y 1 bit para identificación del espécimen. 18 bits denominados CRC 16 CCIT o espacio cíclico de redundancia para la detección de errores, cuya función radica en la transmisión correcta de los datos. 27 bits de extensión, reservados para usos futuros(30).

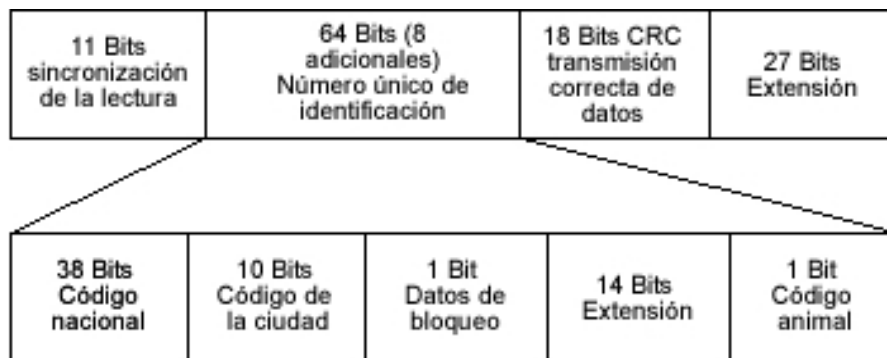


Figura 3. Estructura de la información almacenada en el microchip RFID pasivo

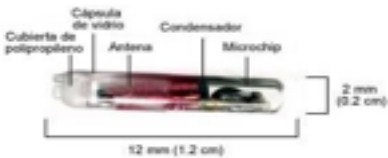
De igual forma la Norma ISO 11785: 1996(31), especifica cómo un microchip se activa y la manera como la información guardada se transfiere a un lector o escáner, esto es el protocolo de transmisión o protocolo radiofrecuencia, el cual debe contar con un protocolo *Full Duplex FDX* cuya función es transmitir la estructura de la información del microchip (Figura 4) y un protocolo *Half Duplex HDX* encargado de iniciar la lectura del microchip una vez el condensador se ha cargado de energía y la señal emitida por el lector o escáner ha finalizado. Además, este protocolo regula el tiempo, la modulación, la frecuencia y el canal de toda la transmisión.

Otras normas internacionales complementarias son la Norma ISO 14223-1: 2001(32), la cual es una extensión de las anteriores, para especificar la autenticación de la estructura del código de la radiofrecuencia empleada por el sistema de identificación en seres vivos, esto es la interfase aérea, el código y su orden de estructura y las diferentes aplicaciones; la Norma ISO 14443: 2001, empleada para definir la distancia (mínimo 10 centímetros y máximo 1.5 metros) que se requiere entre el lector o escáner y el microchip para activar este último, lo cual va a depender de la capacidad de recepción y transmisión de la antena del microchip RFID pasivo. De igual forma controla aspectos como bloqueo de datos, extensión del tiempo de espera de la lectura, multiactivación del sistema, naturaleza de la radiofrecuencia y características de la señal bidireccional; y finalmente la Norma ISO 15693: 2004, dirigida hacia la regulación de los lectores o escáners, controla la distancia de lectura estipulada dependiendo de la frecuencia, la modulación del campo electromagnético y especifica la naturaleza y características de los campos de radiofrecuencia usados así como las comunicaciones bidireccionales entre el lector o escáner y el microchip.

1.3. **VeriChip™**

VeriChip™ es un *transponder* pasivo (implementado por *Applied Digital Solution*, manufacturado por *Digital Angel® Solutions* y distribuido por *VeriChip™ Corporation*) de uso comercial y de implantación sub-cutánea en la región posterior

superior del antebrazo derecho (33) en los seres humanos mediante una jeringa y una cánula en un proceso quirúrgico simple y ambulatorio (Tabla 1). Dicho microchip cuenta con un código único de identificación conformado por 128 bits encriptados. Una vez implantado, su lectura unidireccional se realiza a través de escáner *VeriChip Pocket Reader™* a una distancia aproximada de 10 cm (Tabla 2).

Tabla 1. Componentes y especificaciones técnicas de un microchip RFID pasivo (<i>VeriChip™</i>)		
	Especificaciones técnicas <i>VeriChip™</i>	
	Memoria:	EEPROM
	Frecuencia:	125 KHz. a 134.2 kHz
	Tamaño	12 mm x 2 mm
	Capacidad:	128 bits (16 dígitos)
	Cápsula:	Vidrio de cal
	Antimigración:	Polímero de polipropileno
	Durabilidad:	Hasta 99 años

Este escáner proporciona al *transponder* una pequeña cantidad de voltaje (una milésima de vatio) a través de la frecuencia de radio (134.2 kHz) para activar el microchip con el fin de que este último proporcione el código único de identificación igualmente a través de una frecuencia de radio(33).

El *transponder* consiste en una antena receptora/transmisora conectada a un microchip (el cual almacena el código único de identificación) y un condensador, el cual es el encargado de obtener el voltaje de la radiofrecuencia emitida por el escáner y de esta forma activar el microchip. Estos tres elementos se encuentran recubiertos por una cápsula de vidrio biocompatible de un tamaño no mayor a 12 mm de largo por 2 mm de ancho(34).

VeriChip™ tiene un gran número de aplicaciones potenciales en la vida cotidiana como serían la identificación infalsificable e inviolable para el ingreso a instalaciones de alta seguridad como bases e instalaciones militares, aeropuertos, oficinas gubernamentales, acceso a embajadas, etc.; del mismo modo que resulta una fuente de información en aplicaciones de salud, que proporcionaría el acceso a bases de datos que facilitan el conocer el historial médico de un paciente para ayudar al diagnóstico de enfermedades, identificación de dispositivos médicos como marcapasos, válvulas coronarias o articulaciones artificiales, integración y consulta del historial médico de pacientes que requieren cuidados especiales, y en casos de emergencia, permite la identificación rápida y segura de una persona, sin

necesidad de recurrir a técnicas biométricas como el estudio de huellas dactilares, reconocimiento de voz u otras más sofisticadas.

Tabla 2. Componentes y especificaciones técnicas de un Escáner <i>VeriChip Pocket Reader™</i> (se pueden observar también la jeringa empleada en la implantación sub-dérmica y un microchip)	
	Especificaciones Escáner <i>VeriChip Pocket Reader™</i>
	Material: Plástico
	Frecuencia 125 Khz. / 134.2 Khz
	Tamaño: 285 mm x 80 mm x 32 mm
	Peso: 406 gr
	Energía: 4 Pilas alcalinas AAA
	Pantalla: Display 16 caracteres LCD
	Puerto: Serial RS 232

1.4. Uso de microchips RDIF pasivos

1.4.1. Aplicaciones médicas

Varios investigadores propusieron en 2005 que el manejo administrativo dentro del sistema de salud se podía optimizar mediante el empleo de un sistema interconectado de microchips RFID pasivos que permitieran identificar y hacer seguimiento de los pacientes y los equipos relacionados con estos, no solo en el manejo intrahospitalario sino inclusive en el domicilio(35). Smith (36), manifestó la posibilidad de implantación subcutánea de microchips RFID *VeriChip™* en los pacientes con enfermedades crónicas para su manejo intrahospitalario y domiciliario, lo cual incluye el fácil acceso inalámbrico a la historia clínica completa para obtener información básica como nombre de medicamentos usados, complicaciones, alergias, protocolos farmacológicos, planes de tratamiento, etc., disminuyendo de esta forma el riesgo a suministrar medicamentos equivocados, a su vez, optimizando el tiempo de atención y porque no, salvando la vida de los pacientes debido a la atención idónea y oportuna. Oztaysi *et al*(37), mencionaron que el uso de microchips RFID pasivos dentro de los hospitales, repercutiría positivamente en la prestación de servicios con elevados estándares de calidad,

debido principalmente a la reducción del tiempo en la ejecución de procedimientos administrativos, a la disminución de los márgenes de error, a la rápida identificación y asociación del paciente a su respectiva historia clínica y a todo lo que tiene que ver con el manejo de equipos e insumos médicos. Sin embargo y pese a todas estas ventajas, los autores expresan la limitación ética de la tecnología de radiofrecuencia en el mantenimiento de la confidencialidad y reserva de la información. Mehrjerdi(38), revisó los conceptos fundamentales del proceso de identificación a través de radiofrecuencia (RFID) y su aplicación en los diferentes actores del sistema de salud (pacientes, empleados, equipos, medicamentos y registros), los cuales finalmente fueron destinados a la optimización de la localización y seguimiento de los registros, con el objetivo de minimizar la pérdida de recursos y de información. Yao *et al*(39), indicaron que el empleo de microchips RFID pasivos aumenta la capacidad de seguimiento en tiempo real de equipos, suministros y personal (pacientes, profesionales de la salud y personal administrativo) dentro de los hospitales, sin embargo existen diferentes barreras de aceptación como la limitación tecnológica, la interferencia de la señal, los costos, la falta de estándares globales y la preocupación tácita sobre la invasión a la privacidad. Wamba(40), hizo una revisión sistemática de la literatura (artículos publicados entre 1997 y 2011) en la cual manifestó que los microchips RFID pasivos tienen una importante aplicación dentro del sistema de salud, la cual incluye identificación de los pacientes y sus exámenes de laboratorio y pruebas diagnósticas para evitar confusiones; manejo de las historias clínicas de los pacientes; monitoreo de los pacientes por parte del personal administrativo, técnicos de apoyos y profesionales de la salud, monitoreo de los equipos, organización de los aspectos financieros relacionados con todo el sistema de salud, optimización del inventario de medicamentos, equipos, material desechable, etc., entre otros.

1.4.2. Mecanismo de identificación forense

En la literatura especializada se pudo encontrar diferentes reportes de mecanismos para marcar los diferentes aparatos de rehabilitación oral con fines de identificación. Harvey en 1966(41), Turner *et al* en 1976(42), Ryan *et al* en 1993(43), Berry *et al* en 1995(44), Cross y Wolfaard en 1995(45), Ling en 1998(46), Borrman *et al* en 1999(47) y Reeson en 2001(48) reportaron diferentes materiales y dispositivos (etiquetas en papel, alambre, resina, grabados) para marcar las prótesis de cada paciente para permitir la posibilidad de identificación en caso de muerte.

Moya *et al* (49), reportaron el empleo de alambre ortodóncico de calibre pequeño en la confección de letras y etiquetas de papel con los nombres de los pacientes rotulados, los cuales serían introducidas en el acrílico de las prótesis totales y en los aparatos ortopédicos removibles; y el marcado con las iniciales de los pacientes de los elementos metálicos de las prótesis fijas y removibles mediante instrumentos rotatorios. En 1985 la Asociación Dental Americana (ADA) desarrolló un microdisco acrílico (azul para hombre y rosado para mujeres) de unos 3 a 4 milímetros de

diámetro, el cual sería cementado en la superficie vestibular del primer molar superior derecho. Este dispositivo tendría grabado un código alfanumérico único que identificaría a cada individuo. Pese a que el desarrollo, estandarización y normatividad del microdisco fue llevada a cabo, su uso nunca se implementó por dificultades de registro y licencia(50–52), proponen marcar las prótesis removibles parciales y totales con etiquetas de código de barras, aplicando la tecnología actual de identificación de productos mediante el empleo de un escáner. Ya en 2002, Rajan y Julian(53) indicaron el empleo de microchips con estos fines, para lo cual reportan el estudio de Millet y Jaeannin en 2004 quienes realizaron un estudio en el que incorporan un microchip (*PRODidone; Clerc Edition SA*) de 2.2 mm de diámetro con el objetivo de marcar prótesis totales acrílicas mediante el sistema de lectura o escaneo de RDIF pasivos.

En la actualidad la empresa *Dentalax®* comercializa un microchip (un disco de 6 milímetros de diámetro) y su lector (el cual puede ser un escáner de bolsillo o una tarjeta adaptable a una *pocket pc*) con el fin de etiquetar prótesis removibles parciales y totales que cuenten con acrílico(54).

Richmond y Pretty en 2009(13), describieron la posibilidad técnica de incluir microchips RFID pasivos dentro de las prótesis dentales acrílicas como mecanismo eficiente para identificar individuos. Meyer *et al* en 2006(14), reportaron que el tsunami que en 2004 afectó a Indonesia dejó más de 200.000 cadáveres, los cuales fueron etiquetados en las morgues provisionales con microchips RFID pasivos, lo que contribuyó a que los equipos de atención de desastres funcionaran de una manera mucho más versátil en los procesos de identificación de víctimas y entrega de cuerpos a los familiares sobrevivientes. Thieversen *et al* en 2006(15,16) realizaron un estudio *in vitro* en el cual implantaron varios microchips RFID pasivos de uso veterinario (*EasyTrac-ID®*) en molares humanos, y observaron el comportamiento del sistema, tanto del microchip como el material de obturación empleado, ante fuerzas de compresión, altas temperaturas y termociclado, cuyos resultados argumentan que este tipo de sistemas son de gran utilidad para la identificación de un individuo dentro del contexto forense, pero que dada la naturaleza del dispositivo, se hace necesario desarrollar un microchip específico para implantación dental que optimice los resultados de las pruebas físicas. Moreno *et al* en 2013(55), evaluaron el comportamiento *in vitro* de un microchip RFID pasivo implantado en dientes molares humanos y sometido a fuerzas de compresión para determinar su viabilidad técnica y clínica, concluyendo que, aunque las dimensiones de microchip son grandes y se requiere una cavidad de gran tamaño, desde el punto de vista biomecánico, es plausible hacer dicho procedimiento realizando una cavidad tipo V y empleando un material resinoso para restauración y cementación. De la misma manera, Moreno *et al* en 2013(56), realizaron un experimental *in vitro* que evaluó a través de microfotografía electrónica de barrido (MEB) el comportamiento físico de las interfases de los tejidos dentales, de una restauración en resina compuesta (*Filtek P90™ Silorane 3M-ESPE®*) y un de microchip RFID pasivo (*VeriChip™*) implantado en molares humanos, con el fin de determinar las

posibilidades técnicas y clínicas de la implantación y la viabilidad para resistir las fuerzas de compresión ejercidas por el sistema estomatognático durante la masticación, concluyendo que desde el punto de vista biomecánica las interfases observadas presentan gran resistencia a las fuerzas de compresión y solo evidencian fallas adhesivas a valores extremos que superan la fuerzas del sistema estomatognático.

1.5. *Parylene C*®

La cápsula de vidrio del microchip RFID pasivo se encuentra parcialmente revestido (a manera de una funda) por un material hidrófobo, biocompatible y bioestable, altamente resistente en el medio orgánico e inorgánico, a los ácidos fuertes, a las soluciones cáusticas, a los gases y al vapor de agua. Consiste en un biopolímero de polipropileno poroso patentado como *Parylene C*® y comercializado con el nombre de *Biobond*® (para el caso de microchip empleado en este estudio), el cual cuenta con un espesor de 0,2 micras y cuya función es la de impedir la migración de microchip dentro del tejido implantado debido al principio biológico de estimulación de producción de fibras de colágeno alrededor del implante por parte los fibroblastos (Figura 4).

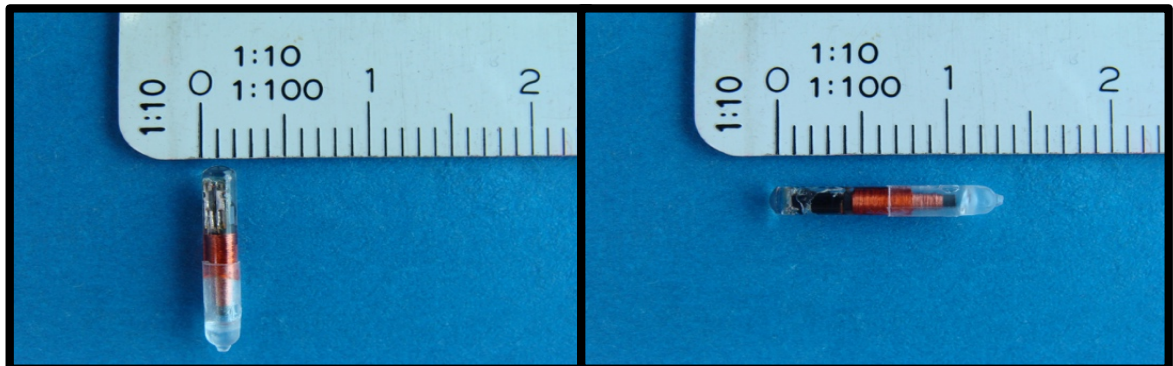


Figura 4. Microchip RFID pasivo (*VeriChip*™). Nótese la funda de *Parylene C*® rodeando parcialmente la cápsula de vidrio hacia el extremo de la derecha.

La migración se produce cuando el microchip RFID pasivo implantado se aleja del lugar original de implantación, lo cual dificultaría su seguimiento y por ende la optimización del cumplimiento de sus indicaciones y funciones. El uso de biomateriales poliméricos resulta esencial en la fabricación de dispositivos médicos que pueden ser implantados quirúrgicamente en el interior del cuerpo de los seres humanos, cuyo efecto resulta en una reacción del tejido a un cuerpo extraño que comprende la encapsulación del implante en una cápsula de colágeno mas no la integración implante-tejido. Es por ello, pensando en la estabilidad del implante, que se han desarrollado modificaciones superficiales de los dispositivos a implantar para

mejorar la interfase y lograr, ahora sí, una integración implante-tejido que optimice significativamente el rendimiento del sistema biológico tisular peri-implantar. Es así como la FDA aprobó el *Parylene C*® como un material polimérico poroso biocompatible capaz de comportarse como una interfase que logra integrar el dispositivo implantado con el tejido peri-implantar(2–5).

1.6. Piel en mamíferos como humanos y roedores (ratones y ratas)

La piel o integumento, es el órgano más extenso del cuerpo, representa el 15% del peso corporal y tapizando hacia el exterior la totalidad del cuerpo en condiciones normales(57–59); hace parte del sistema tegumentario junto con las diferentes fáneras o anexos que incluyen: las unidades pelo-sebáceas, las uñas, las glándulas sebáceas, las glándulas sudoríparas, las glándulas mamarias y los dientes.

Este órgano cumple funciones diversas como lo son proteger el organismo contra agresiones físicas (fricción o golpes), químicas (luz ultravioleta o sustancias) o biológicas externas (microorganismos), controlar la homeostasis del agua, servir como termorregulador corporal, tener regulación sensitiva general, cumplir una función endocrina y paracrina, entre otras(57–59).

La piel presenta diferentes capas y estratos llamados epidermis, dermis y un tejido celular subcutáneo que algunos autores lo denominan como hipodermis, pero en los roedores podemos encontrar una estructura extra denominada panículo carnoso, del cual se hablará más adelante. Entre la piel de humano y roedores se pueden encontrar varias características, mencionadas en la Tabla 3 y vistas en la Figura 5 y la Figura 6.

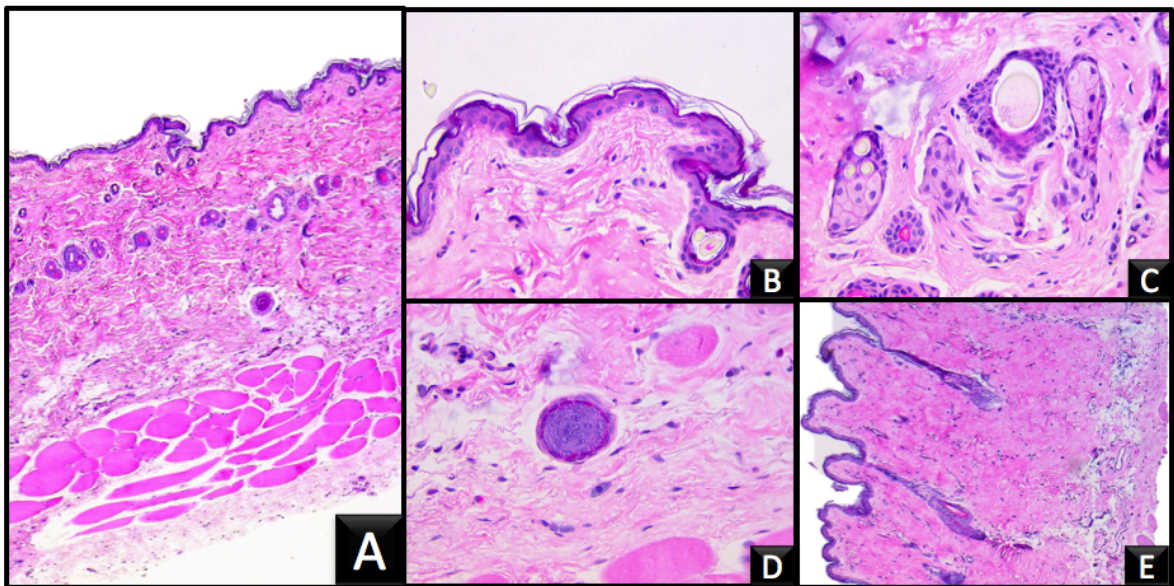


Figura 5. Piel de rata Wistar con sus características de normalidad teñida con Hematoxilina – Eosina. A. Reconstrucción en el plano Y a 10X, observe la distribución de los componentes tisulares que conforman la piel. La representación del músculo hacia nivel basal es el panículo carnoso. B, D, E imágenes a 10X. C. Imagen a 40X, observe un folículo piloso y varias glándulas sebáceas alrededor.

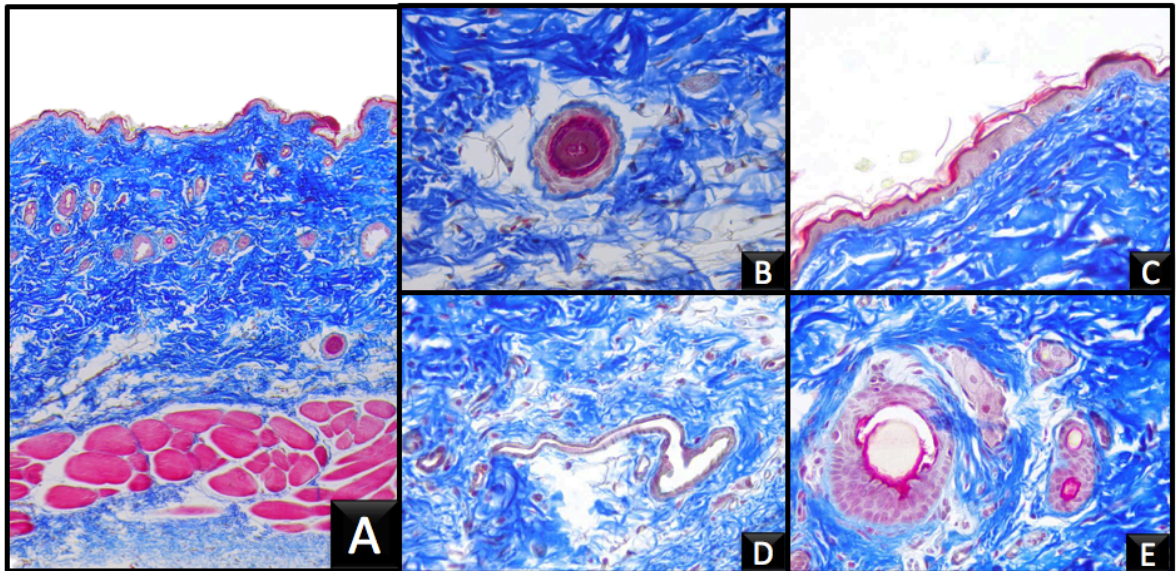


Figura 6. Piel de rata Wistar con sus características de normalidad teñida con Tricrómica de Masson. A. . Reconstrucción en el plano Y a 10X, observe la distribución de los componentes tisulares que conforman la piel. La representación del músculo hacia nivel basal es el panículo carnoso.

Tabla 3. Piel y anexos a partir de Dorsett-Martin W(60) y Treuting P. *Et al*(61) *

Característica	Roedores	Humano
Epidermis	Si, delgada. Epitelio plano estratificado queratinizado	Si, grosor variable. Epitelio plano estratificado queratinizado
Membrana basal	Presente	Presente
Dermis	Presente, escasa dermis papilar	Presente

Grosor epidérmico de la piel corporal (piel delgada)	Delgada (10-15 μ m)	Más gruesa (50-100 μ m)
Grosor epidérmico de la piel gruesa	Cola (70-80 μ m), hocico (20-30 μ m), parpado (50-60 μ m), regiones palmo plantares (150-400 μ m)	Más gruesa (300-400 μ m) Palmas y plantas
Tipos de pelos corporales	Guard Auchene Zig-zag Awl	Vellos Terminales
Otros tipos de pelos	Cilias (Pestañas) Vibrisas faciales Peri-anales Cola Orejas	Cilias (Pestañas) Púbico Púbico facial
Ciclo del pelo Glándulas sebáceas	Patrón en ondas Si	Patrón en mosaico Si
Glándulas sebáceas modificadas	G. Meibomianas G. de Zymbal G. Prepuciales G. Clitorales G. Perianales	G. Meibomianas G. Ceruminosas
Glándulas Ecrinas	Si, regiones palmo plantares	Si, en todo el cuerpo
Glándulas sudoríparas apocrinas	Glándulas mamarias, pero no cuentan con glándulas ceruminosas	Sí; axilas, región genitourinaria, glándulas ceruminosas, glándulas mamarias
Uñas	Si	Si
Panículo caroso	Presente. Músculo estriado esquelético	Ausente

*Tabla adaptada y modificada.

1.6.1. Epidermis

La epidermis es la capa más superficial de la piel, constituida histológicamente como un epitelio plano estratificado queratinizado, constituido principalmente por queratinocitos (aproximadamente 90% de las células de la epidermis) y otros tipos

de poblaciones celulares como las células de Langerhans, los melanocitos, las células de Merkel y los linfocitos intraepiteliales. Embriológicamente se empieza a formar pasado el proceso de gastrulación a partir del ectodermo de superficie por la señalización de Wnt que bloquea la capacidad de respuesta del ectodermo al Factor de Crecimiento Fibroblástico y seguido a esto, la expresión de las células de Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs), que destinan a dicha porción del ectodermo a evolucionar a epidermis, la cual, inicialmente estaba formado por una capa única de células madre denominada peridermo.

A su vez, la epidermis madura está formada por 5 capas celulares:

- Estrato basal.
- Estrato espinoso.
- Estrato granuloso.
- Estrato lucido.
- Estrato corneo.

Se encuentran 4 tipos celulares diferentes: queratinocito (célula más abundante en epidermis. Mitóticamente activos en la capa basal, van desplazando otros queratinocitos hacia la superficie), melanocito (origen en la cresta neural, no posee uniones desmosomales), células de Langerhans (procesos dendríticos, bajo presentación antigénica), células de Merkel(60).

A pesar de ser un biomodelo ampliamente utilizado, es escasa la literatura que hace la caracterización histológica y morfométrica de la piel de la rata, en especial de la cepa Wistar, por lo que se hace necesaria hacer la descripción histológica de las células y estructuras anexas que constituyen la epidermis, dermis e hipodermis bajo condiciones de normalidad en la arquitectura tisular, es decir, cuando la piel no ha sufrido ningún tipo de traumatismo debido a un agente externo.

.1.6.2. Dermis y faneras o anexas.

- Unión dermo-epidérmica. Compuesta por hemidesmosomas, lámina basal y tejido conectivo.
- Dermis: Formada por tejido conectivo entre la epidermis y la hipodermis. Tiene una capa papilar y otra reticular. La capa papilar es tejido conectivo laxo, contiene vasos sanguíneos pequeños, linfa y nervios; se pueden encontrar células como fibroblastos, macrófagos y mastocitos. Se encuentran colágeno fino y fibras elásticas. La capa reticular contiene plexo vascular, linfa, nervios y apéndices. Se encuentran fibras colágenas tipo I compactas y fibras elásticas gruesas.
- Hipodermis: Tejido adiposo.
- Apéndices: Glándulas sebáceas, Glándulas sudoríparas (asociada con los folículos pilosos, libera sus productos de secreción en el lumen, conducto recto), músculos erector pili. En cuanto al sistema circulatorio, este está comprendido por un plexo subpapilar, un plexo cutáneo y un suplemento

arterial y drenaje venoso en la hipodermis⁹. Aunque estructuralmente es consistente en todo el cuerpo, la piel varía en espesor según el sitio anatómico y la edad del individuo⁹. Piel en biomodelo: Rata Wistar Las ratas han sido comúnmente usadas para estudios sobre curación de heridas en piel y se han evaluado las diferentes modalidades de tratamiento, dada su disponibilidad, bajo costo y tamaño. Si bien estas características permiten acceder al biomodelo como un recurso potencial para evaluar cicatrización o reparación de heridas, hay condiciones fisiológicas, histológicas y morfológicas que hacen evidente, discrepancias en los procesos reparativos entre humanos y ratas(60,61).

1.7. Lesiones tumorales asociadas a microchips de implantación subcutánea

Dada la gran demanda de implantación y uso masivo de microchips RFID pasivos con fines de identificación en animales y la posibilidad de masificar su uso en seres humanos (para lo cual la FDA aprobó la implantación desde 2004), surge la controversia del desarrollo de lesiones tumorales asociadas a la implantación subcutánea de los microchips. Sin embargo, los escasos estudios que existen en la literatura se limitan a la presentación de casos esporádicos y eventuales, los cuales fueron agrupados en el llamado “reporte Caspian”(9) el cual hace una revisión sistemática de la literatura entre 1990 y 2006, publicada en el CASPIAN Consumer Privacy.

El reporte consiste en una revisión definitiva de los estudios que demuestran una relación causal entre la implantación subcutánea de microchips RFID pasivos y cáncer, en ratones de laboratorio y perros. La autora evalúa 11 artículos previamente publicados en revistas de toxicología y patología, encontrando que entre 0,8% y 10,2% de los ratones y ratas de laboratorio desarrollaron lesiones malignas en el tejido conectivo peri-implantar alrededor del microchip, principalmente sarcomas, los cuales presentaron metástasis y finalmente indujeron la muerte del animal, hasta tal punto que se recomienda la prohibición del uso de microchips de implantación subcutánea en humanos. Peso a todo ello, varios reportes han demostrado lo contrario.

Rao y Edmoson(6), estudiaron biopsias de tejido peri-implantar a 3, 15 y 24 meses de uso subcutáneo de microchips en 70 ratones, concluyendo que en la evaluación microscópica se observó una delgada cápsula constituida por fibroblastos y fibras de colágeno maduro, con mínimos signos de inflamación y tejido granulomatoso; y ausencia total de cambios neoplásicos. Ball *et al*(62), analizaron la interfase implante-tejido conectivo luego de hasta un año de implantación de microchips RFID pasivos en ratas; encontrando ocasionales células inflamatorias subagudas presentes en el tejido subcutáneo luego de dos semanas después de la implantación y una cápsula fibrosa de tejido conectivo maduro desde las 12

semanas. Gruys *et al*(63) estudiaron el tejido subcutáneo peri-implantar en cerdos a los que se les implantó un microchip RFID pasivo para determinar su nivel de biocompatibilidad. Como grupo control emplearon pruebas de citotoxicidad en cultivos de fibroblastos humanos y test de hemólisis en sangre humana, lo cual demostró biocompatibilidad. Los hallazgos de los autores indican que no hubo reacción de tipo cuerpo extraño y que se formó una cápsula fibrosa de 0,2 mm de grosor alrededor del implante asociados a procesos cicatrizales, reconociendo que la implantación subcutánea de microchips RFID pasivos es plausible desde el punto de vista biológico. Tillman *et al*(7), realizaron un estudio en 4279 ratones en los que encontraron en 36 especímenes, lesiones tumorales con fibrosarcomas e histiocistoma fibroso maligno asociadas al tejido conectivo peri-implantar. Jansen *et al*(64), evaluaron 90 microchips RFID pasivos (45 solo con cápsula de vidrio, 30 solo con cápsula de vidrio grabada con ácido y 15 con cápsula de vidrio recubierta parcialmente con *Parylene C*®) implantados de manera subcutánea en 15 perros, encontrando luego de 16 semanas de implantación que el 50% de los microchips migraron desde su sitio de implantación (sin importar el *Parylene C*®), que todos los microchips fueron rodeados por una cápsula de tejido fibroso y que no se observa una reacción inflamatoria grave. Blanchard *et al*(65), diseñaron un biomodelo de utilidad a partir de ratones transgénicos (*knock-out* de gen para p53) para estudios a corto plazo sobre cancerogenicidad, en los que estudiaron 177 especímenes a los que se les implantaron microchips (solo con cápsula de vidrio y con recubrimiento parcial polimérico) y la formación de lesiones tumorales - denominadas por los autores como displasia mesenquimal- que pueden conllevar a un sarcoma. Elcock *et al*(66), estudiaron la toxicidad crónica y la oncogenicidad en el tejido peri-implantar en ratas a las que se les implantó un microchip RFID pasivo, encontrando una tasa baja (1%) de tumoralidad de origen mesenquimal (schwannoma maligno, fibrosarcoma, sarcoma anaplásico y sarcoma histiocítico) con metástasis ocasional, procesos tumorogénicos asociados a la reacción a cuerpo extraño. Le Calvez *et al*(67), en tres estudios de cancerogenicidad en ratas con microchips RFID pasivos implantados de forma subcutánea, reportaron 52 lesiones tumorales de origen mesodérmico (excepto dos asociadas a la glándula mamaria) en el tejido peri-implantar. Los patrones inmunohistoquímicos para definir las lesiones compatibles con sarcomas fueron desmina, actina de músculo liso (SMA), miogenina, S100, lo cual les permitió concluir, además del estudio histológico, que se trataban de sarcomas no específicos con un componente miofibroblástico importante. Linder *et al*(68), compararon histológicamente el tejido peri-implantar subcutáneo de ratas macho a quienes se les implantaron microchips solo con su cápsula de vidrio y recubiertos parcialmente con *Parylene C*®, titanio y óxido de aluminio. Los autores concluyeron que alrededor de los microchips aumentan los niveles de celularidad y que particularmente, en los microchips recubiertos con *Parylene C*® se podía describir una reacción a cuerpo extraño. Gruda *et al*(69), estudiaron 175 ratones a los cuales les implantaron microchips RFID pasivos con el objetivo de determinar el grado de biocompatibilidad, de tal forma que los autores manifiestan que existe un nivel bajo de reacción a cuerpo extraño y baja frecuencia de toxicidad y carcinogenicidad, llamando la atención al

diseño experimental a corto plazo. Schutt *et al*(70), describieron la incidencia de un sarcoma asociado a la implantación de un microchip en una musaraña, a partir de una masa local subcutánea móvil en el dorso interescapular en donde se había implantado el microchip y en el que describieron células tumorales, proliferación celular e inflamación en el tejido, lo que promovió la transformación neoplásica mesenquimal en el tejido adyacente, la cual tenía características de un fibrosarcoma (positivo para enolasa y actina de músculo liso). Hestekin *et al*(71), realizaron un estudio para probar el potencial clínico de la rápida detección de cáncer relacionado con genes en un sistema de electroforesis por microchip, bajo la premisa que el gen p53 es el más comúnmente alterado en los cánceres humanos.

1.8. Respuesta Granulomatosa a Cuerpo Extraño Secundaria a biomateriales y formación del granuloma

El siguiente apéndice es el resultado de un producto de investigación publicado en la Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas bajo el título: Reacción a cuerpo extraño por implantación de un microchip.

Todo biomaterial implantado en el cuerpo puede provocar una reacción inflamatoria en los tejidos adyacentes llamada **Respuesta Granulomatosa a Cuerpo Extraño Secundaria a biomateriales y formación del granuloma** (RGCE secundaria a biomateriales de aquí en adelante), la cual su aparición y progreso depende de ciertas propiedades físicas y químicas del material implantado como la forma, el tamaño, la rugosidad, el diseño, la morfología, la porosidad, la composición, los problemas de esterilidad, la duración de contacto y la degradación de la superficie del biomaterial(72,73).

Durante la implantación, la alteración morfo-funcional inmediata de los tejidos desarrolla un proceso inflamatorio agudo, el cual desencadena una inflamación crónica para finalmente resolverse con la formación de un granuloma en los tejidos peri-implantares(8,10,73). La RGCE secundaria a biomateriales se describe a partir de la relación, desde una perspectiva de la respuesta inmune innata, entre macrófagos, células gigantes y la interfase entre los tejidos peri-implantares y la superficie de los materiales de recubrimiento del microchip RFID pasivo, lo cual genera una respuesta inflamatoria que incluye: 1. La interacción entre la sangre y el biomaterial; 2. La formación de una matriz provisional dependiente de la configuración de la superficie del biomaterial; 3. La inflamación aguda (infiltración de polimorfonucleares –neutrófilos– y mastocitos tisulares); 4. La inflamación crónica (infiltración de monocitos y linfocitos); 5. La reacción a cuerpo extraño propiamente dicha (adhesión de monocitos a la superficie del biomaterial, diferenciación de macrófagos, fusión de macrófagos y conformación de células gigantes); 6. La formación del tejido de granulación (proliferación y migración de fibroblastos y angiogénesis); y 7. El desarrollo de una cápsula fibrosa (secreción de colágeno alrededor del biomaterial) por parte de los fibroblastos(8,10,74,75).

1.8.1. Adsorción de proteínas

Las interacciones entre los componentes de la sangre y los biomateriales del dispositivo constituyen la primera respuesta del huésped ante la lesión e implican una respuesta inflamatoria inicial que se activa por la lesión de la vasculatura de los tejidos conectivos subcutáneos. Al ocurrir la salida de sangre de los vasos sanguíneos lesionados por el implante, se activan las vías extrínseca e intrínseca de la coagulación, el sistema del complemento, el sistema fibrinolítico y la agregación plaquetaria, lo que trae consigo la conformación de trombos alrededor de los biomateriales a partir de los componentes bioquímicos (agentes mitógenos, factores quimiotácticos, citoquinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento entre otros agentes bioactivos), estructurales (componentes de la matriz extracelular del tejido conectivo) y celulares (macrófagos residentes del tejido conectivo) para que se den los procesos de cicatrización de la herida (punción por la implantación y penetración del dispositivo implantado) y la reacción a cuerpo extraño. Este proceso es reconocido como el efecto Vroman (mientras más rugoso sea el biomaterial más proteínas adsorben y más se favorece la adhesión de células inflamatorias), e implica la adsorción de proteínas plasmáticas –albúmina, fibrinógeno, complemento, fibronectina, vitronectina y globulina– en la superficie de los biomateriales para conformar una matriz extracelular transitoria a partir de fibrina(8,10).

De esta forma, inmediatamente después de generada la lesión, se producen cambios en el flujo vascular (calibre de los vasos, permeabilidad endotelial, presión coloido-osmótica, entre otros) que permiten la salida de proteínas plasmáticas y elementos figurados de la sangre hacia los tejidos lesionados a través de un exudado que hace parte de la respuesta inflamatoria, en respuesta a una serie de mediadores químicos de la inflamación que incluyen agentes vasoactivos (histamina, serotonina, prostaciclina, endotelina, tromboxano, etc.), proteasas plasmáticas (sistema de las quininas –bradiquinina y calicreína–, sistema del complemento –C3a, C5a, C3b, C5b-C9–, sistema fibrinolítico y sistema de la coagulación –productos de la degradación de fibrina, activador de plasminógeno tisular–), leucotrienos (LTB₄), proteasas lisosomales (colagenasa y elastasa), radicales libres derivados de oxígeno, factores de activación de plaquetas, citoquinas pro-inflamatorias como interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF- α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β), factor de crecimiento epitelial (EGF). Si bien todos estos elementos son secretados desde el inicio de la respuesta inflamatoria, será el tipo de células (neutrófilos, monocitos y macrófagos) los que predominen en dicha respuesta y en diferentes momentos, los que regulen su secreción(8,10).

Para su unión molecular a las proteínas adsorbidas en la superficie del biomaterial, las células inflamatorias deben expresar integrinas, las cuales se relacionan con sus ligandos fibronectina y laminina, para establecer un mecanismo molecular de

adhesión. Inclusive, las integrinas son fundamentales en la posterior adhesión y fusión de macrófagos para formar células gigantes, del mismo modo que son importantes en la remodelación tisular mediante la regulación de la muerte celular programada a partir del desprendimiento de las células de la matriz extracelular (anoikis)(76).

Por tanto, la adhesión celular a un dispositivo implantado depende de las proteínas que se absorben en la superficie de los biomateriales, por lo que las mismas tienen propiedades variables para promover la unión entre las integrinas y las capas de proteínas(8,10,74,77).

1.8.2. Formación de la matriz provisional

Tras la lesión del tejido conectivo durante la implantación, la alteración de la solución de continuidad del lecho vascular conduce al inmediato desarrollo de la matriz provisional en el lugar del implante. Esta matriz provisional consiste principalmente en la agregación de fibrina debido a la activación de las cascadas de la coagulación y los productos pro-inflamatorios liberados por el sistema del complemento(78).

Esta red de fibrina inicia los procesos de reparación tisular a partir de la agregación plaquetaria, las cuales producen PDGF y TGF- β para reclutar fibroblastos(79). Del mismo modo, la red de fibrina contribuye al proceso de angiogénesis alrededor del sitio de implantación con el objetivo de amplificar las respuestas inflamatorias. Por tanto, toda la red de fibrina, fibronectina, trombospondina factores mitógenos, factores quimiotácticos y citoquinas pro-inflamatorias, se constituye en una matriz provisional que estabiliza estructural y bioquímicamente el proceso de cicatrización de la herida(10).

1.8.3. La respuesta inflamatoria aguda

Esta respuesta inflamatoria es de duración relativamente corta (desde unos cuantos minutos hasta unos pocos días) dependiendo de la extensión de la lesión. Ocurre desde el momento mismo en que el dispositivo es implantado debido a la lesión de los tejidos (daño del colágeno tipo IV de la matriz extracelular), a partir de procesos celulares y moleculares que pretenden reparar la lesión morfo-funcionalmente a través de la formación de una matriz provisional que incluye el sangrado inicial, la formación del coágulo de fibrina, el edema (exudado de líquido y proteínas plasmáticas) y la migración leucocitaria (neutrófilos y monocitos), como parte de una respuesta de cicatrización en la proximidad de los tejidos peri-vasculares del sitio de la lesión(8,80).

Respecto a la migración leucocitaria, se puede observar la migración por extravasación de polimorfonucleares neutrófilos desde el torrente sanguíneo al sitio del implante, la degranulación y liberación de histamina por parte de mastocitos para reclutar monocitos y neutrófilos (células características de la inflamación

aguda). El reclutamiento de monocitos desde el torrente sanguíneo para su posterior diferenciación en el tejido conectivo peri-implantar durante los procesos de inflamación, angiogénesis, hematopoyesis, diferenciación de linfocitos y cicatrización, se produce en respuesta a factores quimiotácticos como quimioquinas (citoquinas con propiedades quimio-atractivas) y citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, interleuquina 6 (IL-6) y TNF- α , los cuales a su vez guían a los macrófagos recién diferenciados al sitio del implante, en co-acción con la histamina liberada por los mastocitos. La respuesta inflamatoria aguda generada por los biomateriales del dispositivo durante el proceso de implantación cutánea suele dar paso a la respuesta inflamatoria crónica(8,10,75,81,82).

Una vez lesionado el tejido por la implantación y constituida la matriz provisional, la migración leucocitaria desde el interior de los vasos sanguíneos hacia los tejidos peri-implantares, corresponde a un proceso de migración celular altamente regulado por selectinas, integrinas, moléculas de adhesión, quimioquinas, citoquinas y metaloproteasas entre otros. Inicialmente, los neutrófilos interactúan con las células endoteliales al interior de los vasos sanguíneos para disminuir su velocidad de tráfico y establecer contactos estables mediados por selectinas en donde el neutrófilo rueda por la superficie interna del endotelio(83).

A continuación tiene lugar la adhesión firme de los neutrófilos a la superficie del endotelio a partir de la expresión de integrinas tras la liberación de quimioquinas. En este momento, la presencia de estas quimioquinas en la superficie endotelial, constituye un frente de movilización (gradiente de quimio-atracción) el cuál guía a los neutrófilos a pasar a través del espacio intercelular de dos células endoteliales (diapédesis) y/o a través de la célula endotelial (transmigración endotelial). Una vez fuera del vaso, los neutrófilos se localizan en el sitio de implantación para dar inicio a la fagocitosis (de micro-organismos y materiales extraños). La fagocitosis corresponde a un proceso en el que el neutrófilo u otras células fagocíticas como el macrófago o las células dendríticas, reconocen por medio de receptores, se adhieren, y modifican el citoesqueleto para endocitar el antígeno en una vesícula denominada fagosoma, el cual se fusiona con los lisosomas para constituir el fagolisosoma y destruir al microorganismo por medio de las enzimas lisosomales. Al final del proceso la célula muere por apoptosis. El proceso ocurre de forma más eficiente cuando los antígenos son opsonizados por una serie de factores séricos reconocidos como opsoninas, dentro de las cuales, la inmunoglobulina G (IgG) y el fragmento del complemento activado 3 (C3b), se han asociado a la opsonización de las superficies de los biomateriales. Sin embargo, si el antígeno resulta en un material extraño más grande que la célula no ocurre la fagocitosis, como es en el caso de la implantación de microchips RFID pasivos; por lo que se puede generar un proceso denominado fagocitosis frustrada, en el cual las enzimas lisosomales sintetizadas por las células fagocíticas escapan al medio extracelular⁵¹. En este caso, la acción del neutrófilo adherido a la superficie del dispositivo implantado es liberar estas enzimas para intentar degradar el biomaterial, lo cual no ocurre debido a que el vidrio *Bioglass®* y el material anti-migratorio de recubrimiento parcial

Parylene C® no son biodegradables, sin embargo, estas enzimas pueden generar alteración de las proteínas extracelulares y generar daño en el tejido, dando así, paso al establecimiento de una respuesta inflamatoria de tipo crónico, pues el evento no es resuelto(8).

1.8.4. La respuesta inflamatoria crónica

La respuesta inflamatoria crónica es de larga duración y se limita a los tejidos peri-implantares que se encuentran en contacto con los biomateriales del dispositivo implantado [36]. Ocurre después de la inflamación aguda por la presencia constante del estímulo (en este caso el dispositivo implantado). Su curso, histológicamente menos organizado que la inflamación aguda, se caracteriza por la presencia de monocitos, macrófagos, células plasmáticas, linfocitos y células gigantes en la interfase entre los biomateriales del dispositivo y los tejidos peri-implantares, por la proliferación de tejido conectivo y por la angiogénesis. Finaliza con la formación de un tejido granulomatoso a partir del coágulo de fibrina, de la proliferación de fibroblastos y de la misma angiogénesis(8,10,75,80,84).

Durante este proceso crónico, los monocitos y los macrófagos activados se constituyen en las células más importantes, debido al gran número de productos biológicos que producen para estimular la diferenciación y reclutar células que van a remodelar histológicamente los tejidos epiteliales y conectivos afectados durante la implantación, y a los tejidos conectivos peri-implantares(84).

1.8.5. La formación del tejido de granulación

Posterior a los procesos inflamatorios agudos y crónicos, se constituye un tejido de cicatrización sano (precursor de la cápsula fibrosa) caracterizado por la presencia de macrófagos, la infiltración de fibroblastos (con fenotipo de células de músculo liso o mio-fibroblastos) para síntesis de los componentes de la matriz extracelular y regulación de la contracción de la lesión; y la angiogénesis por gemación tras la proliferación, maduración y organización de las células endoteliales en los tejidos peri-implantares. Si bien este tejido de granulación marca el comienzo de la resolución (tres a cinco días después de la implantación) de las respuestas inflamatorias, la cicatrización depende de la intensidad y magnitud de la lesión durante la implantación. En el caso de la implantación de un microchip RFID pasivo, no se da un proceso de cicatrización final dado que la RGCE se perpetúa, por lo que en el tejido de granulación los macrófagos activados diferencian su fenotipo a células epitelioides que se fusionan entre sí para constituir células gigantes de cuerpo extraño que rodean al dispositivo implantado constituyendo un granuloma(85).

1.8.6. La reacción granulomatosa de tipo cuerpo extraño (RGCE) secundaria a biomateriales

Al finalizar la respuesta inflamatoria crónica, el tejido de granulación se separa de la interfase entre los tejidos peri-implantares y los biomateriales del dispositivo para constituir un granuloma, el cual cuenta con una matriz extracelular sintetizada por

fibroblastos con fenotipo de mio-fibroblastos reclutados desde los tejidos peri-implantares, abundantes vasos sanguíneos producto de angiogénesis y macrófagos. Al ocurrir la fagocitosis frustrada inicialmente por neutrófilos (inflamación aguda) y finalmente macrófagos (inflamación crónica)(8), estos últimos adquieren un fenotipo funcional de células epitelioides y empiezan a fusionarse entre sí para constituir células gigantes como un mecanismo de escape a la muerte celular programada(76).

La RGCE secundaria a biomateriales obedece entonces a los macrófagos y células gigantes multinucleadas que persisten en la interfase entre el granuloma y las superficies de los biomateriales que recubren al microchip RFID pasivo durante toda su vida útil, la cual puede extenderse más allá de los 20 años. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre la transición de los macrófagos hacia su posterior fusión en células gigantes, asociado principalmente a la naturaleza la superficie de los dispositivos y su capacidad de adsorber proteínas una vez implantado(8,85,86).

Estas células gigantes de cuerpo extraño, que marcan el paso de la RCE, tiene origen en la fusión de los macrófagos derivados de los monocitos en un proceso regulado por la secreción de interferón gama (IFN- γ), la interacción de las integrinas con receptores de manosa y las proteínas adsorbidas (fundamentalmente la vitronectina) por la superficie de los biomateriales, todos estos requisitos principales que deben ocurrir para que los macrófagos se fusionen y mantengan la multinucleación. Es por esto que los biomateriales que recubren los dispositivos implantables deben proporcionar un adecuado ambiente bio-mimético que asegure la adhesión, orientación, migración y supervivencia de las células, específicamente del macrófago, quién debe realizar la secreción de citoquinas para iniciar los procesos inflamatorios, debe fusionarse para guiar la reacción a cuerpo extraño y debe fusionarse para controlar la formación del granuloma(87,88).

Quizás uno de los aspectos más estudiados y característicos de una reacción a cuerpo extraño frente a un biomaterial es el reclutamiento de macrófagos y formación de células gigantes. Estos eventos celulares obedecen a la producción de citoquinas y otros factores quimiotácticos producidos durante la inflamación, a la degranulación de mastocitos (liberación de histamina) y a la liberación de factores de crecimiento, leucotrienos e interleuquinas, los cuales atraen los macrófagos a la superficie del biomaterial(89).

Para que haya fusión de macrófagos activados (células epitelioides) se requiere que los monocitos se encuentren adheridos a la superficie del biomaterial, es decir, la conformación de células gigantes a partir de la fusión de macrófagos obedece a las interacciones de las células y la matriz extracelular de los tejidos peri-implantares y de la capa de adsorción de proteínas adheridas a la superficie del dispositivo. Esta configuración de los macrófagos se organiza en dos fenotipos, el primero o la célula gigante de Langhans en donde los núcleos excéntricos se disponen en forma de herradura, y el segundo o la célula gigante de cuerpo extraño propiamente dicha

en donde los núcleos centrales se encuentran desorganizados. En la actualidad se desconoce la diferencia funcional de estos dos tipos de células, inclusive poco se sabe de su actividad biológica(90).

La presencia de células gigantes multinucleadas fue descrita por primera vez por Langhans en 1868, al describir el granuloma por tuberculosis. Dadas sus diferencias histo-morfológicas, las células gigantes de Langhans se observan en las enfermedades granulomatosas infecciosas como la tuberculosis, caracterizadas por un número relativamente pequeño de núcleos (generalmente menos de 20) dispuestos en una en la periferia del citoplasma en forma de herradura. Estas células se observan en los granulomas inmunes junto con macrófagos epitelioides, asociados a partículas digeribles y rodeadas por un collar de leucocitos mononucleares –linfocitos TCD4+ activados del perfil Th1 encargados de producir IFN- γ y TNF- α para iniciar la fusión de macrófagos para constituir células gigantes–. Mientras que las células gigantes de cuerpo extraño se observan precisamente en RGCE secundaria a biomateriales más exactamente en la interfase entre el tejido peri-implantar y las superficie del dispositivo implantable, caracterizadas por tener un gran número de núcleos (más de 20) dispuestos en el citoplasma de forma irregular y estar asociadas a macrófagos y partículas no digeribles que se encuentran rodeadas por una cápsula de tejidos conectivo denso irregular rica en colágeno. En este tipo de lesiones no hay collar de mononucleares presente. Otras células consideradas como células gigantes son el osteoclasto y la célula T CD4+ inducida por el virus VIH-1 en sincitios *in vitro*(8).

Según la evidencia conocida hasta el momento en el granuloma inmune las células gigantes de Langhans se forman por la fusión de macrófagos inducida por linfocitos T CD4+ del perfil Th1 a partir de la expresión de IFN- γ y TNF- α , lo cual ocurre de forma similar en la reacción a cuerpo extraño[34]; sin embargo, diferentes estudios han identificado dos factores que pueden explicar la formación de células gigantes de cuerpo extraño, el primero es la composición química del biomaterial de recubrimiento del dispositivo y la capacidad de adsorción de proteínas del mismo; de esta forma, se ha determinado que las cápsulas de vidrio reducen notablemente la adherencia de macrófagos, por lo que la presencia de células gigantes es casi nula(77,91,92).

1.8.7. La conformación de la cápsula fibrosa

La conformación de la cápsula fibrosa o fibrosis, es la última respuesta del proceso de cicatrización ante una lesión ocasionada por la implantación de un microchip RFID pasivo; es decir, ante la incapacidad local del organismo de fagocitar o degradar los biomateriales del dispositivo implantable, este los encapsula de tal forma que queda aislado de los diversos factores que generan respuestas inflamatorias; de allí que todo el proceso reparativo incluya la regeneración de los tejidos epiteliales y conectivos afectados y la sustitución en el sitio de la lesión de tejido conectivo denso irregular rico en fibra colágena tipo I y tipo II, de acuerdo a la respuesta de los diferentes linajes de células(90).

Por lo general, la reparación y posterior regeneración de los tejidos que se encuentran en la zona de la lesión y en los tejidos peri-implantares, pueden presentar diversas respuestas de acuerdo a la extensión de la lesión, de los efectos de bio-compatibilidad de los materiales que constituyen la cápsula y el recubrimiento de los microchips RFID pasivos, y de la capacidad de regeneración de las células que constituyen los tejidos implicados. Esta última se encuentra determinada por el origen de los diferentes linajes de células, de tal forma que se consideran las células estables que proliferan durante toda la vida (células de origen epitelial –células de epitelios de revestimiento y de epitelios glandulares– y células de origen mesenquimal –fibroblastos, miocitos lisos, endoteliales, osteoblastos entre otras–) y las células permanentes que no proliferan después del nacimiento (neuronas, miocitos estriados esqueléticos y miocitos estriados cardíacos). Las primeras inician los procesos de reparación a partir de respuestas inflamatorias para restituir la estructura normal de los tejidos y, en tal caso de no resolver la lesión por este medio pueden optar por la fibrosis, mientras que las segundas tratan de restituir los tejidos a partir de respuestas inflamatorias sin llegar a la fibrosis. No obstante, ambos linajes de células pueden verse obligados a experimentar adaptaciones celulares como disminución de tamaño y fusión (atrofia), aumento de tamaño y función (distrofia), proliferación descontrolada de poblaciones celulares (hiperplasia), cambio del fenotipo de poblaciones celulares (metaplasia). Todas estas adaptaciones morfo-funcionales de las células pueden ocasionar inhibición o sobre-expresión de factores de crecimiento que modifican el microambiente de tal forma que se pueden activar procesos dirigidos hacia el aumento del crecimiento y de la proliferación celular, característicos de las neoplasias(8). (Figura 7)

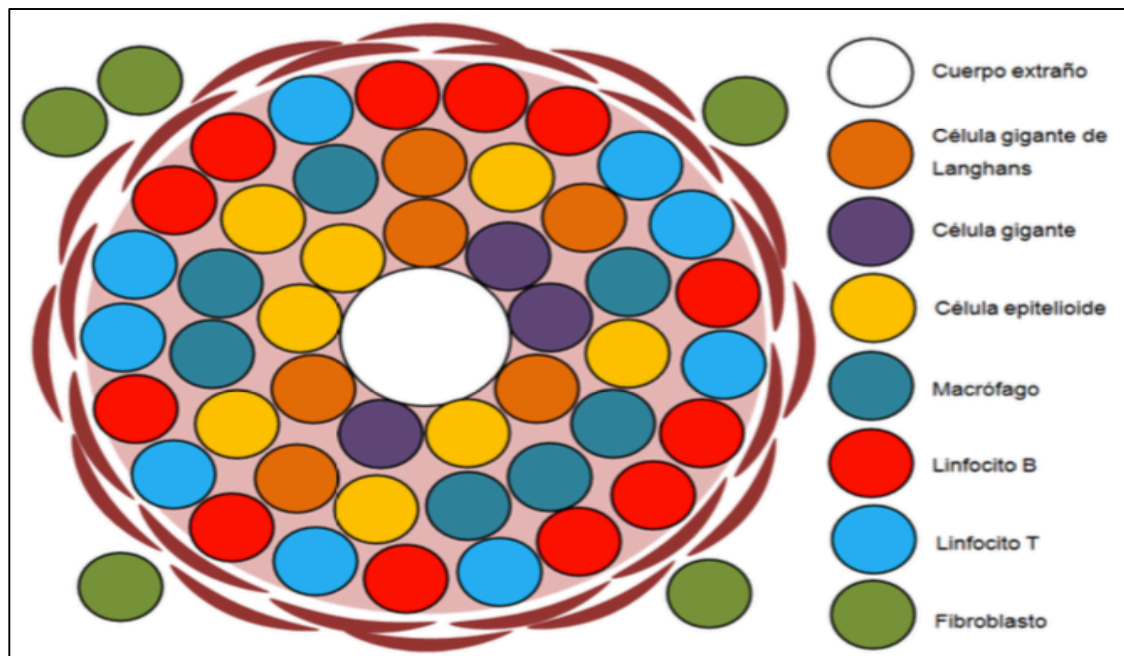


Figura 7. Representación de la organización celular que conforman una RGCE secundaria a biomateriales. Extraído de López C *et al*(1)

1.9. Neoplasias

La tumorigénesis a partir de una reacción a cuerpo extraño ha sido explicada a partir de la sola presencia física del biomaterial y la reacción que ocasiona, mas no por la naturaleza química del mismo, es decir el curso crónico de las respuestas inflamatorias y el grado de fibrosis. Del mismo modo que está demostrado que el origen de la lesión pre-neoplásica no ocurre a partir de los monocitos, macrófagos o fibroblastos, sino de las células mesenquimáticas multipotenciales asociadas a los vasos sanguíneos y de las células que derivan de estas, como son la célula endotelial, el miocito liso y los pericitos, dado que las células pre-neoplásicas si bien se han localizado en el sitio de implantación, no se encuentran en la interfase de los tejidos peri-implantares con la superficie de los biomateriales(93).

El uso de microchips RFID pasivos implantados en animales de laboratorio (murciélagos, monos, conejos, musarañas, ratones, ratas y algunos anfibios), de uso doméstico (perros y gatos) y de uso ganadero (equinos, porcinos, ovinos y vacunos), se ha empleado con fines de identificación desde finales de 1980. Si bien es un método aparentemente confiable (aséptico, menos doloroso, bajo costo, durable, inalterable y sin probabilidad de error humano) para identificar animales, existen reportes de la formación de neoplasias en los tejidos peri-implantares. Tal como se ha descrito, durante tres meses después de la implantación, se genera una respuesta inflamatoria que se resuelve con la encapsulación del dispositivo a través de una cápsula de tejido conectivo rica en fibras de colágeno o granuloma, lo cual

no influye con el funcionamiento del microchip. Sin embargo, diferentes reportes de la literatura han descrito la posterior formación de neoplasias que dan origen a tumores asociados a tejidos de origen mesenquimal. El mecanismo fisio-patológico se ha descrito como tumorigénesis inducida por una RGCE secundaria a biomateriales (66,94), y consiste en una serie de eventos secuenciales y específicos que incluyen 1. La proliferación celular y la infiltración de linfocitos durante la fase de inflamación aguda; 2. La conformación de una cápsula fibrosa alrededor del cuerpo extraño; 3. La inactivación de la actividad fagocitaria de los macrófagos durante la fase de inflamación crónica; y 5. La disponibilidad de una superficie (cuerpo extraño) para el contacto directo con las células pre-neoplásicas, las cuales tiene su origen en las células mesenquimales multipotenciales asociadas a la micro-vasculatura y que reaccionan durante la fase de inflamación aguda de la RGCE (93).

Respecto a tumorigénesis a partir de microchips RFD pasivos implantados de forma subcutánea, técnicas histológicas convencionales (tinciones hematoxilina-eosina, PAS –reacción de Shift del ácido periódico– y tricrómica de Masson) han descrito lesiones mal delineadas en la región peri-implantar, sin o con restos de una cápsula de tejido conectivo, focos de necrosis y aumento en la densidad celular con núcleos de morfología pleomórfica, multilobuladas, poligonales, circulares y fusiformes, estroma fibro-vascular denso y posibilidad de presencia de células gigantes multinucleadas(67).

De igual forma, a partir del análisis inmunohistoquímico, se pueden aplicar diferentes anticuerpos específicos durante la técnica histológica convencional en el proceso de fijación con formaldehído o en inclusión en parafina, en la recuperación de los antígenos mediante diferentes técnicas y en la implementación de sistemas de detección de dichos antígenos(95), con el propósito de realizar el diagnóstico diferencial de lesiones benignas y lesiones malignas (tumores de tejidos blandos y tumores de origen no mesenquimal)(96).

De esta forma, los marcadores moleculares más empleados como primera línea en este tipo de análisis son los que dependen de la morfología de las células tumorales como la miogenina (proteína reguladora miogénica que consiste en un factor de transcripción de la familia MyoD), la enolasa neuroespecífica (marcador enzimático del daño neuronal), la vimentina (filamentos intermedios expresados por células de origen mesenquimal), la actina de músculo liso (se une a la actina alfa del músculo liso), la proteína S100 (proteína ligada al transporte de calcio), la desmina (filamentos intermedios de miocitos lisos e inusualmente de fibroblastos), CD57 (proteína superficial de linfocitos T y linfocitos NK) y p53 (factor de transcripción reconocido como el “guardián del genoma” que impide que las células tumorales proliferen) entre otros. Sin embargo, estos marcadores no son específicos de una lesión tumoral en particular, razón por la cual se deben combinar entre si y poder discriminar algunas lesiones benignas poco frecuentes, tumores malignos de origen no mesenquimal y sarcomas(97).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Identificar los cambios tisulares producidos por la implantación subcutánea de un microchip RFID pasivo recubierto con *Parylene C*® en rata Wistar.

2.2. Objetivos específicos

- Describir los cambios presentes en la piel de la rata Wistar a nivel de la epidermis, dermis, tejido celular subcutáneo, panículo adiposo y panículo carnososo para los grupos de estudio.
- Determinar la presencia de una RGCE secundaria a biomateriales, junto con el tipo de infiltrado inflamatorio en la región tisular peri-implantar para los biomodelos de todos los grupos y la descripción de sus principales células (control histológico, intervención 1, intervención 2).
- Determinar la formación histológica de una cápsula fibrosa alrededor del elemento implantado para los biomodelos de todos los grupos (control histológico, intervención 1, intervención 2).
- Comparar la formación de una cápsula fibrosa, la presencia y tipo de inflamación de acuerdo con el tipo de material de revestimiento (vidrio – Parylene).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de estudio

Ésta es una investigación experimental de tipo descriptivo-analítico de corte longitudinal. (Tabla 4).

Tabla 4. Tipo de estudio					
Naturaleza de estudio	Temporalidad	Unidad de Análisis	Asignación de la exposición	Número de observaciones por individuo	Criterios de selección de la población de estudio
Experimental	Longitudinal	Bloques parafinados	Aleatoria	Una para cada tiempo de seguimiento	Por conveniencia

3.2. Muestra

La muestra de esta investigación estuvo compuesta por ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar -desarrollada en el *Wistar Institute* en 1906 para fines de investigación biomédica- del Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, entregadas para el estudio a la edad de 5 meses, con un peso igual o mayor a 300g previo a la realización del procedimiento quirúrgico ambulatorio de implantación del microchip RFID pasivo o la cápsula de vidrio, y la punción para el grupo de control histológico.

De acuerdo al Teorema del Límite Central, una muestra de 30 es considerada significativa, dado que *“sin tener en cuenta la forma funcional de la población de donde se extrae la muestra, la distribución de las medias muestrales, calculadas con muestras de tamaño n extraídas de una población con media m y varianza finita s^2 , se aproxima a una distribución normal con media m y error estándar s^2/n , cuando n aumenta. Si n es grande, $n \geq 30$, la distribución de medias muestrales puede aproximarse mucho a una distribución normal”*(98).

3.2.1. Criterios de inclusión

- Ratas de cepa Wistar de 5 meses de edad.
- Machos.
- Nutricionalmente sanos.

3.2.2. Criterios de exclusión

Ratas que durante o posterior al proceso de implantación subcutánea de la cápsula de vidrio, del microchip RFID pasivo o del procedimiento quirúrgico, resulten afectadas por:

- Infección en el lugar de implantación.
- Hemorragia por mala técnica de la implantación.
- Muerte espontánea del biomodelo.
- Avulsión extracorporal del dispositivo implantado.
- Otro tipo de complicaciones intra y postquirúrgicas diferentes a las mencionadas.

3.2.3. Tamaño y distribución de la muestra

El tamaño de la muestra (N) para este estudio fue de 28 ratas de la cepa Wistar, criadas bajo pedido al Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. Posterior a su entrega y con el fin de cumplir el principio de la aleatoriedad, se distribuyeron los especímenes al azar entre los tres grupos muestrales contemplados dentro del estudio por medio del programa Microsoft Excel®. Con base a los números dados al azar por el programa, se pudo distribuir con aleatoriedad las ratas para cada grupo.

En cada grupo se hizo la siguiente distribución: A 12 especímenes (de los números 1 al 12) se les implantó un microchip RFID pasivo (grupo intervención 1), a 12 especímenes (de los números 13 al 24) se les implantó una cápsula de vidrio inerte con las mismas dimensiones del microchip (grupo intervención 2) y se sometieron 4 especímenes (de los números 25 al 28) al a un procedimiento quirúrgico sin implantación de algún dispositivo (grupo control histológico) (Tabla 5). Cabe resaltar que este grupo de control histológico no se constituye como un patrón de normalidad, sino que se establece como un modelo en el cual se define si la punción sin implantación afecta de igual forma en cualquier nivel del espesor cutáneo, por lo tanto, siempre, el patrón de normalidad de la piel será la descripción realizadas en las pruebas piloto mencionadas anteriormente.

Tabla 5. Distribución de la muestra		
Grupo intervención 1 (I1)	Grupo intervención 2 (I2)	Grupo control Histológico (CH)
Implantación de un microchip RFID pasivo recubierto parcialmente con Parylene C®	Implantación de cápsula de vidrio inerte sin ningún tipo de recubrimiento	Sin implantación
12	12	4

3.3. Consideraciones éticas

Todos los biomodelos fueron manipulados (28 especímenes correspondientes a ratas de la cepa Wistar del Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle) de acuerdo a las normas éticas Nacionales e Internacionales reunidas en el manual de dicha Dependencia, razón por la cual, todos los investigadores que estuvieron involucrados con los animales realizaron el Curso de Inducción al Bioterio, con el propósito de recibir inducción, instrucción y entrenamiento general, sobre la estructura organizativa y de servicios del Bioterio, normas de bioseguridad, funcionamiento del mismo y requerimientos para el manejo de animales de experimentación, esto para garantizar el seguimiento de los lineamientos de investigación especificados en el Manual del Bioterio de la Universidad del Valle incluyendo el uso de las normas de bioseguridad y el desarrollo de los protocolos adecuados para asegurar la calidad de la investigación y preservar los principios universales de ley que reglamentan en uso de animales de experimentación como son: el respeto por los animales, el establecimiento de condiciones nutricionales, sanitarias y ambientales optimas, no causar daño innecesarios a los biomodelos y mitigar el dolor. Igualmente, practicar la eutanasia con anestesia en los casos de sacrificio de animales, reducir los impactos ambientales o no poner en peligro las especies, usar el número de animales adecuado que garanticen la validez del resultado, y usar los sustitutos como modelos con células u otros para modelar un problema a resolver(99).

Los procedimientos que se realizaron en el presente estudio, evitaron/aliviaron el sufrimiento de los animales de experimentación, ya que durante las etapas experimentales estuvieron bajo sedación profunda. Durante la permanencia en el bioterio, el bienestar de los biomodelos fue continuamente supervisado los investigadores, con la ayuda del personal del bioterio asignado. Así mismo, todos los procedimientos fueron llevados a cabo teniendo presentes la legislación vigente sobre experimentación en biomodelos y bioseguridad durante el manejo de los mismos(100,101).

Para verificar los protocolos y el cumplimiento de la legislación, este proyecto de investigación contó con el aval del Comité de Ética Animal de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, tanto para iniciar el proceso de investigación *per se*, como para presentarlo a Convocatorias Internas o Externas para financiación con el código de referencia No. 03-013 de 2013.

3.4. Trabajo de campo

El trabajo de experimentación se dividió en tres fases operativas realizadas en el Laboratorio de Histología, el Departamento de Morfología y el Bioterio, todas, dependencias de la Universidad del Valle, Sede San Fernando a partir del visto bueno para ejecución de los recursos provenientes de la Convocatoria Interna 2013-

I de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle, de la cual este trabajo fue beneficiado.

Las tres fases fueron definidas de la siguiente forma:

- a) Fase I: Recepción de biomodelos e implantaciones.
- b) Fase II: Procesamiento histoquímico de muestras de piel.
- c) Fase III: Análisis histopatológico descriptivo.

3.4.1. Fase I: Recepción de biomodelos e implantaciones

3.4.1.1. Entrega de especímenes en el Bioterio y asignación a los grupos

28 ratas fueron entregadas por el Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle al momento de estas cumplir 5 meses de edad y con un peso corporal igual o mayor a 300gr, verificado al momento de la entrega. Se atendieron las normas del Ministerio de Salud de Colombia para el cuidado de animales de experimentación y se aseguró el libre suministro (*ad libitum*) de agua limpia, la libre alimentación balanceada (alimento comercial para animales de laboratorio tipo murinos Rodent Lab Diet®), la eliminación adecuada de excretas, un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas respectivamente, una temperatura ambiental entre 20°C y 24°C y condiciones de humedad del 55%, contenidas en jaulas acondicionadas para este tipo de biomodelos; todos estos datos verificados y suministrados por el personal del bioterio a cargo. Los animales recibieron atención continua de los investigadores y el personal profesional adscrito al Bioterio(99).

Los especímenes fueron numerados del 1-28 y asignados al azar mediante una tabla de números aleatorios, procedimiento explicado previamente. De igual forma, cada modelo fue pesado tres veces para tener el cálculo de un promedio inicial de peso y contrastarlo con el peso final previo a la eutanasia.

3.4.1.2. Procedimiento de implantación subcutánea de Microchip RFID pasivo y cápsulas de vidrio

En los especímenes que hacían parte de los grupos intervención 1 e intervención 2, se implantó un microchip RFID pasivo (*VeriChip™*) recubierto parcialmente con *Parylene C®* y una cápsula de vidrio inerte sin ningún tipo de recubrimiento respectivamente, por medio de una jeringa-cánula específica para estos dispositivos. Se esterilizó cada jeringa-cánula con el microchip RFID pasivo o cápsula de vidrio dentro de ellas en un equipo autoclave de gas. Se hizo antisepsia en el área de piel del lugar de implantación con yodopovidona impregnado en una gasa estéril previo a cada procedimiento. Se escogió la región interescapular siguiendo la recomendación de la Asociación Mundial Veterinaria de Animales Pequeños (WSAVA por sus siglas en inglés) donde menciona que aquellos

mamíferos donde la longitud sea menor a 17 cm, se debe realizar la implantación por vía subcutánea entre las escapulas(102), además, esta región ofrece fácil acceso, fácil control de permanencia de posición y es anatómicamente seguro.

Para minimizar el estrés y dolor del biomodelo durante el procedimiento, se sedó a cada animal con Isoflurano al 100% (*Isoflurano USP® Baxter®*) impregnado en una mota de algodón y exponiéndolo a inhalación directa hasta el punto que el biomodelo perdiera la movilidad y sensibilidad al pellizco en cola y patas; posterior a la sedación del biomodelo y en posición decúbito prono, se procedió a insertar la punta de la jeringa-cánula, elevando la piel de la región interescapular y penetrando subcutáneamente 1cm y totalmente paralelo a la región dorsal, procediendo luego a posicionar el dispositivo con el émbolo que tiene la jeringa-cánula. Una vez implantado, se verificó manualmente la posición del dispositivo en la piel, se marcó la jaula de cada animal con la codificación numérica, se comprobó la recuperación de actividad motora del biomodelo y se aisló finalmente cada sitio de implantación con gasa estéril fijada con esparadrapo. Para el caso de los biomodelos implantados con el microchip, se escaneó la región interescapular a través del Escáner *VeriChip Pocket Reader™* para obtener el número de identificación electrónica y se incluyó en cada jaula y hoja de vida, un papel adhesivo del fabricante con dicho número, para corroborarlo cada vez que fuera necesario. Cada semana se escaneó y palpó a los especímenes en la región implantada para verificar el correcto funcionamiento del microchip RFID pasivo implantado y de la conservación en posición de dichos dispositivos, incluyendo las cápsulas de vidrio (Figura 8). El protocolo de implantación se adecuó a partir de una prueba piloto pero teniendo como referencia el protocolo recomendado por el fabricante (Ver Sección de anexos: 9.2.1. Protocolo de implantación de microchip RFID pasivo y 9.2.2. Protocolo de implantación cápsula de vidrio inerte).

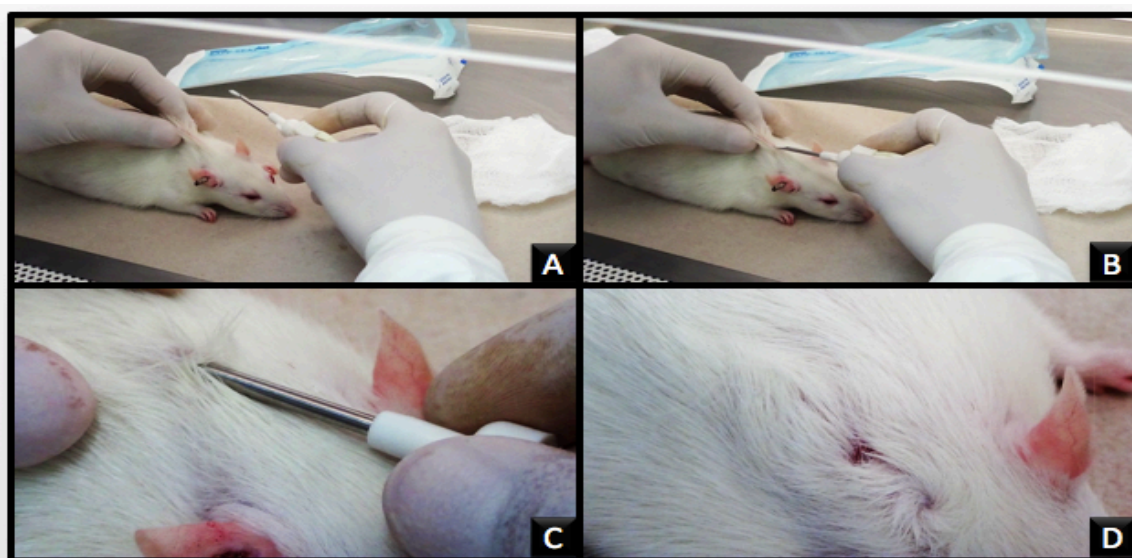


Figura 8. Proceso de implantación subcutánea de microchip RFID pasivo en rata

Wistar. El mismo procedimiento fue usado para la implantación de las cápsulas de vidrio y las punciones. Ubicado el modelo en posición decúbito prono (A), se inserta la punta de la jeringa-cánula, elevando la piel de la región interescapular y penetrando subcutáneamente 1cm y totalmente paralelo a la región dorsal, procediendo luego a posicionar el dispositivo con el embolo que tiene la jeringa-cánula (B, C, D).

3.4.1.3. Procedimiento punción subcutánea sin implantación

En los especímenes que hacían parte del grupo control histológico, se hizo el mismo procedimiento descrito previamente en la sección **“Procedimiento de implantación subcutáneo de Microchip RFID pasivo y cápsulas de vidrio”** exceptuando la implantación de algún dispositivo, esto con el fin de encontrar los efectos tisulares que genera el procedimiento de implantación en la piel comparado con los especímenes implantados y que podrían afectar el análisis y descripción entre los grupos experimentales (Ver Sección de anexos: 9.2.3. Protocolo de punción sin implantación). Este grupo fue escogido con el fin de evaluar si el proceso inflamatorio y de cicatrización correspondiente al trauma generado por la punción, es suficiente para producir cambios tisulares como los posiblemente observables en la piel de un biomodelo que ha tenido implantado un microchip RFID pasivo recubierto con Parylene C® u otro compuesto solamente por vidrio(9).

3.4.1.4. Sedación para implantación y punción sin implantación

Para todos los procedimientos de implantación, se pesaron los animales y luego se les indujo sedación profunda mediante anestesia inhalatoria con Isoflurano al 100% (*Isoflurano USP® Baxter®*) frasco 100ml mediante inhalación directa sobre una mota de algodón impregnada al volumen correspondiente por el cálculo de dosis establecido para cada biomodelo. De igual forma, a cada animal se le administró analgesia postquirúrgica vía oral con *Tramadol®* gotas 100mg/ml frasco por 10 ml, a una dosis de 2mg/100gr cada 12 horas durante las primeras 48 horas de postoperatorio diluido en el dispensador de agua de cada jaula.

3.4.1.5. Manejo de los biomodelos a partir de la entrega por parte del bioterio y asignación de los grupos

Una vez se entregaron los biomodelos por parte del bioterio y habiéndose verificado el cumplimiento de los criterios de inclusión para cada uno de los animales de estudio, se diseñaron cinco etapas cronológicas para la obtención de las biopsias escisionales de piel en la región punzada e implantada. Para cada uno de los procedimientos quirúrgicos mencionados a continuación y teniendo en cuenta las

secuelas que dejarían en los animales vivos, se sometieron todos los biomodelos a eutanasia (Tabla 6 y 7):

- Primera etapa (descrita previamente):
 1. A los cinco meses de nacidos, a cada uno de los doce especímenes del grupo intervención 1 se les implantó un microchip RFID pasivo (*VeriChip™*) recubierto parcialmente con *Parylene C®*.
 2. A los cinco meses de nacidos, a cada uno de los doce especímenes del grupo intervención 2 se les implantó una cápsula de vidrio inerte sin ningún tipo de recubrimiento.
 3. A los cinco meses de nacidos, a los cuatro especímenes del control histológico se les hizo el procedimiento de punción con la jeringa-cánula sin implantación de microchip RFID pasivo o cápsula de vidrio.
- Segunda etapa:
 1. A los dos meses del procedimiento de implantación, a tres especímenes del grupo intervención 1 se les hizo una biopsia escisional de la región interescapular.
 2. A los dos meses del procedimiento de implantación, a tres especímenes del grupo intervención 2 se les hizo una biopsia escisional de la región interescapular.
 3. A los dos meses de la punción, a un espécimen del control histológico se le hizo una biopsia escisional de la región interescapular.
- Tercera etapa:
 1. A los cuatro meses del procedimiento de implantación, a tres especímenes del grupo intervención 1 se les hizo una biopsia escisional de la región interescapular.
 2. A los cuatro meses del procedimiento de implantación, a tres especímenes del grupo intervención 2 se les hizo una biopsia escisional de la región interescapular.
 3. A los cuatro meses de la punción, a un espécimen del control histológico se le hizo una biopsia escisional de la región interescapular.
- Cuarta etapa:
 1. A los seis meses del procedimiento de implantación, a tres especímenes del grupo intervención 1 se les hizo una biopsia escisional de la región interescapular.

2. A los seis meses del procedimiento de implantación, a tres especímenes del grupo intervención 2 se les hizo una biopsia escisional de la región interescapular.
 3. A los seis meses de la punción, a un espécimen del control histológico se le hizo una biopsia escisional de la región interescapular.
- Quinta etapa:
 1. A los ocho meses del procedimiento de implantación, a tres especímenes del grupo intervención 1 se les hizo una biopsia escisional de la región interescapular.
 2. A los ocho meses del procedimiento de implantación, a tres especímenes del grupo intervención 2 se les hizo una biopsia escisional de la región interescapular.
 3. A los ocho meses de la punción, a un espécimen del control histológico se le hizo una biopsia escisional de la región interescapular.

Tabla 6. Manejo de la muestra luego del procedimiento de implantación					
Procedimiento	Primera etapa Implantación/punción (5 meses después de nacimiento)	Segunda etapa Eutanasia y biopsia (2 meses después de primera fase)	Tercera etapa Eutanasia y biopsia (4 meses después de primera fase)	Cuarta etapa Eutanasia y biopsia (6 meses después de primera fase)	Quinta etapa Eutanasia y biopsia (8 meses después de primera fase)
Grupo Intervención 1	12	3	3	3	3
Grupo Intervención 2	12	3	3	3	3
Grupo Control Histológico	4	1	1	1	1
TOTAL	28	7	7	7	7

3.4.1.6. Sedación y eutanasia con medio inhalado

Para todos los procedimientos de eutanasia de los 28 animales, se pesó previamente a cada animal y luego cada uno se llevó a sedación profunda mediante anestesia inhalatoria con Isoflurano al 100% (*Isoflurano USP® Baxter®*) frasco 100 ml a una concentración tóxica que generara parálisis muscular, falla cardio-respiratoria y muerte del biomodelo, en un periodo aproximado de 10 minutos, realizado dentro de una campana de vidrio sellada. Por este periodo, se monitoreo cada animal, tiempo durante el cual se verificó el cese de la respiración, la ausencia de latidos cardiacos, la presentación de córnea opaca y relajación de esfínteres. En presencia de estos signos de muerte, se realizó la biopsia escisional de piel (región que contuviera el microchip RFID pasivo o capsula de vidrio, las zonas de piel

punzadas sin implantación y el tejido peri-implantar). Finalizado el procedimiento de toma de las biopsias, se depositó cada biomodelo en el congelador de residuos biológicos dentro en una bolsa roja para luego entregarla a la ruta hospitalaria de acuerdo con el protocolo de manejo de residuos anatomopatológicos del Departamento de Morfología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle y el PGIRS de la Universidad del Valle(103).

3.4.2. Fase II: Procesamiento histoquímico de muestras de piel

Para concertar los pasos correctos de esta fase y asegurar que todos los procedimientos fueran estandarizados, el estudiante de postgrado, cursó las asignaturas “Técnicas Histoquímicas Básicas” y “Técnicas de inmunohistoquímica” en donde realizó dos pruebas piloto:

- a) En la asignatura “Técnicas Histoquímicas Básicas” realizó la prueba piloto sobre el proceso de biopsia, manipulación de la muestra y procesamiento histoquímico de piel de rata Wistar, con la cual se pudo establecer los protocolos para fijación y tinción para las muestras de este estudio.
- b) En la asignatura “Técnicas de Inmunohistoquímica” realizó la prueba piloto sobre marcaje de VEGF en la piel de rata Wistar con herida en reparación causada por una cánula de implantación subcutánea de microchips RFID pasivos. No se obtuvieron resultados positivos en cuanto al marcaje usando el anticuerpo VEGF (Thermo Scientific™ Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Ab-7, Mouse Monoclonal Antibody) para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, por lo cual, para efectos de este estudio, no se contempló el uso de estas técnicas.

En cuanto a los fallos en la prueba piloto de la Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia, se deben resaltar varios puntos respecto a la naturaleza de la muestra y los procedimientos usados, que pudieron ser claves para que no se tuviera un resultado positivo en ambas técnicas histológicas:

- El VEGF espera encontrarse prioritariamente en zonas donde se esté dando neovascularización. Si bien toda la región subcutánea de la región interescapular de la rata fue lesionada, es muy probable que la expresión de dicha molécula esté limitada prioritariamente al sitio inicial de lesión, donde quedó un defecto morfológico que cursaría como una cicatrización por segunda intención, así que se esperaría que en esta región se diera un mayor marcaje para VEGF dado que se espera que este (en especial VEGF α) se exprese desde el momento del trauma hasta una semana después.

- Puede que VEGF se exprese en un periodo de tiempo más limitado que en el cuerpo humano, por lo que la expresión detectable por inmunomarcación sería mucho antes que 5 días posteriores al trauma.
- En el Data-Sheet del anticuerpo primario utilizado (Thermo Scientific™ Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Ab-7, Mouse Monoclonal Antibody) se especifica que es para uso de muestras humanas y que no se han hecho los estudios suficientes para determinar si es viable en otras especies. Puede que este anticuerpo primario no identifique el VEGF de la rata Wistar como un antígeno y por ende, no se pueda dar la reacción antígeno-anticuerpo, trascendental en los procesos de inmunomarcación (aplica para IHQ-C e IF).
- Hay diferencias notables en cuanto al sistema de detección tanto en la IHQ-C como en la IF. Para el caso de la IHQ-C hay pobre inmunomarcación y es totalmente inespecífica, mientras que en la IF la inmunofluorescencia es inespecífica pero es muy abundante en toda la muestra (efecto background). Esto puede deberse a:
 - Como se mencionó anteriormente, el anticuerpo primario no haya reconocido al VEGF como antígeno y no se haya dado la reacción Ag-Ac, por lo que, en el caso de IHQ-C el sistema de detección pudo generar poca o nada detección, a pesar de la concentración Ac Primario : solución que se preparó (1:200).
 - Para el caso de la IF, el Alexa Fluor 555® estaba en concentración máxima (1:500) por lo que probablemente, pudo retenerse en el tejido, a pesar de que este Ac Secundario fuera un anti-mouse y por ende, no pudiera reconocer las proteínas celulares de la rata como antígenos.
 - Para el caso de la IF, los lavados con PBS no fueron suficientes posterior a la exposición de los cortes al Anticuerpo Secundario Alexa Fluor 555®.
 - Para el caso de la IHQ-C, se usaron tiempos de deshidratación y aclaramiento de 3 minutos, que pudieron diluir en buena parte la inmunomarcación.
- La técnica de “floating” no parece ser la mejor forma para manipular muestras de piel, dada la complejidad estructural de la muestra (al tener diversos tejidos), el enredamiento entre cortes en cada pozo y la complejidad de manejar adecuadamente la técnica. Sería recomendable para todo estudio con piel, recoger los cortes directamente en un portaobjetos con superficie cargada.

El procedimiento descrito en los próximos puntos que corresponden a la fase II, son el resultado de la primera prueba piloto.

3.4.2.1. Biopsia del lugar de implantación (microchip y tejido peri-implantar), fijación y conservación de la muestra

Posterior a la eutanasia de cada animal y con la zona quirúrgica previamente establecida con todos los insumos necesarios en posición, se realizó una tricotomía en la zona de implantación, y posterior a esto, se realizó la biopsia de piel para los biomodelos de la etapa respectiva para cada uno de los grupos definidos (Tabla 6). La biopsia incluyó el microchip RFID pasivo implantado, o cápsula de vidrio implantada, o región punzada además de un área de tejido peri-implantar que abordó la epidermis, la dermis y el tejido celular subcutáneo, teniendo unas biopsias de una extensión aproximada de 30mm (largo) x 30mm (ancho) x 3mm (espesor) (Figura 7).

Tabla 7. Distribución de los biomodelos en las fases de estudio					
Biomodelos	Primera etapa	Segunda etapa	Tercera etapa	Cuarta etapa	Quinta etapa
Grupo Intervención 1	Todos	13, 17, 21	14, 18, 22	15, 19, 23	16, 20, 24
Grupo intervención 2	Todos	1, 5, 9	2, 6, 10	3, 7, 11	4, 8, 12
Grupo Control Histológico	Todos	25	26	27	28

Una vez obtenido el bloque de la biopsia, se sumergió cada biopsia en frascos plásticos individuales debidamente rotulados que contenían una solución de formol buferado (100 ml de formol al 37%, 900 ml de agua destilada, 0.4 ml de sodio-fosfato monobásico y 0.65 ml de sodio-fosfato dibásico) en una relación volumen – muestra de 10:1 con la finalidad de fijar las muestras, es decir: 1) prevenir los cambios postmortem como putrefacción y autólisis; 2) preservar los constituyentes de las células como si estuviesen vivos; 3) proteger los tejidos durante la manipulación de los procedimientos subsiguientes con cierto grado de “dureza”, 4) favorecer el paso de las células de una consistencia semi-fluida a una semi-sólida; y 5) ayudar a la diferenciación visual de algunas estructuras(104–106).

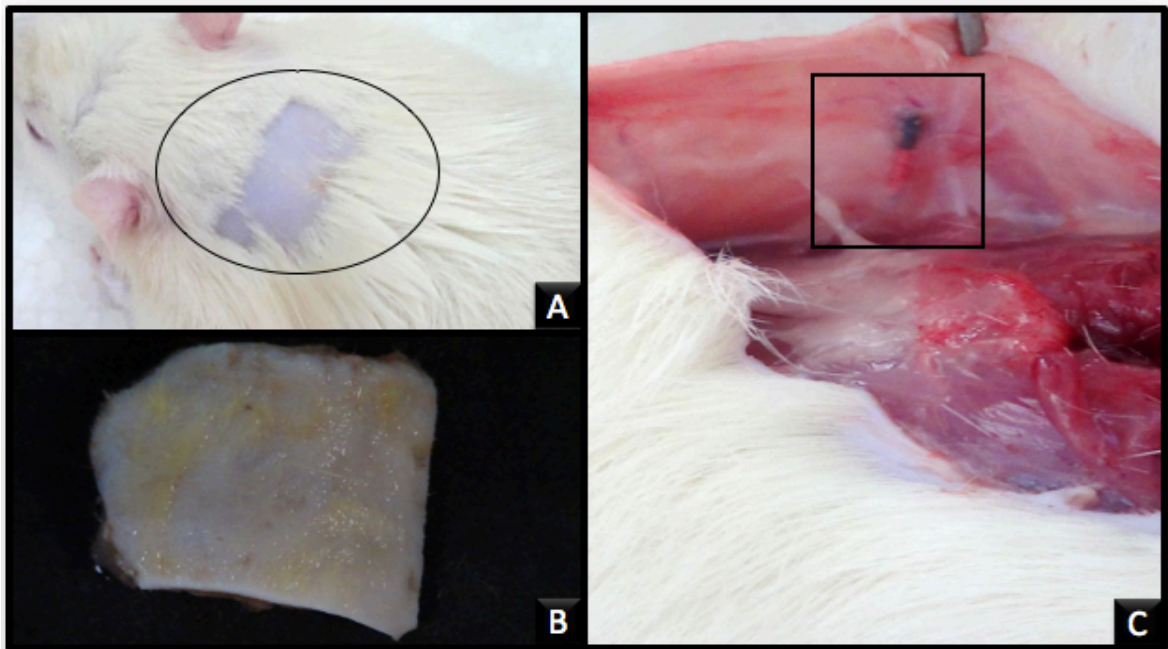


Figura 9. Biopsia de biomodelo implantado con microchip RFID pasivo. Se puede observar la tricotomía realizada en la region dorsal-escapular (circulo negro) de la rata Wistar(A). Se observa el dispositivo implantado en posición (rectangulo negro) y el colgajo libre de piel que representa la biopsia obtenida (B, C).

No se retiraron de posición los microchips RFID pasivos o las cápsulas de vidrio, con la finalidad de conservar el defecto tisular y la posición de los tejidos inmediatamente próximos al dispositivo (Figura 8). Los frascos llevaban una codificación única para cada muestra, de acuerdo al grupo que pertenecían (I1, I2, CH), la etapa (2M, 4M, 6M, 8M) y la fecha de realización del procedimiento. Las muestras fueron fijadas por 108 horas (4.5 días) bajo una temperatura ambiente de laboratorio entre 20°C a 22°C teniendo en cuenta los resultados y recomendaciones del estudio sobre uso de formalina y formol de Buesa y Peshkov(107). Se almacenaron todos los frascos en un cuarto aislado, libre de exposición de luz directa y humedad dentro del Laboratorio de Histología del Departamento de Morfología de la Universidad del Valle (Ver Sección de anexos: 9.2.6. Protocolo de obtención de biopsia de piel de rata Wistar y 9.2.7. Protocolo de fijación de biopsia de piel de rata Wistar).

Tal como se manifestó anteriormente, una vez finalizado el procedimiento de toma de las biopsias, se depositó cada biomodelo en el congelador de residuos biológicos dentro en una bolsa roja para luego entregarla a la ruta hospitalaria de acuerdo con el protocolo de manejo de residuos anatomopatológicos del Departamento de Morfología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle(103).

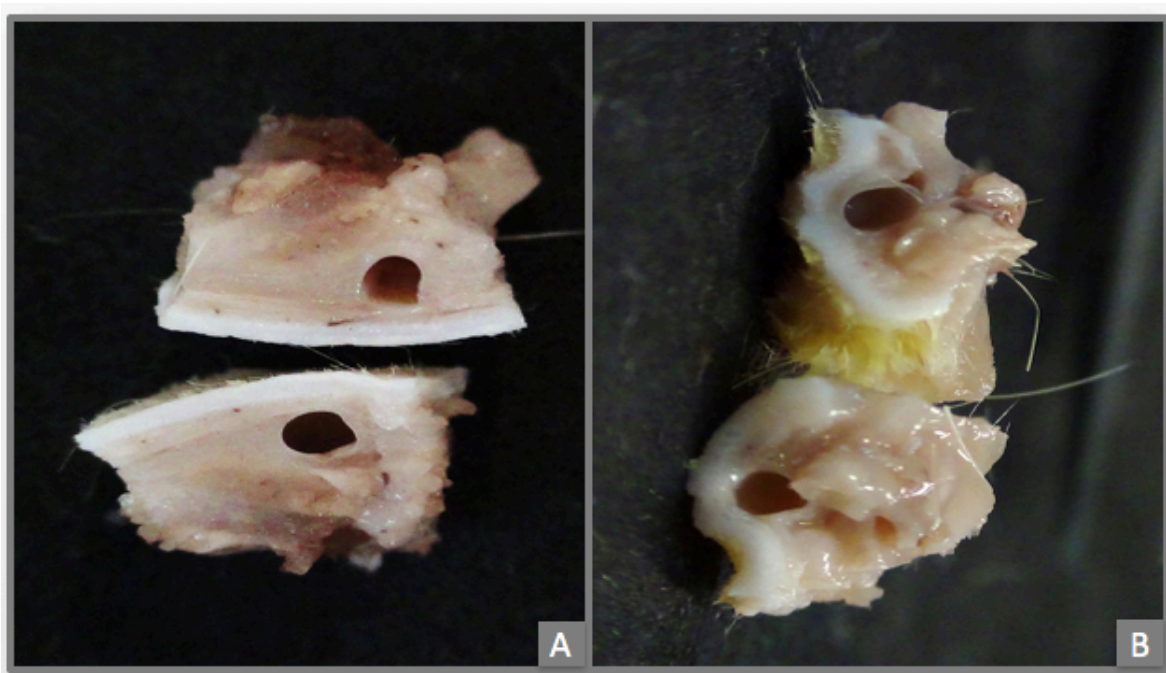


Figura 10. Muestras de piel en post-fijación con formol buferado. Observe el defecto subcutáneo que queda en el sitio de implantación.

3.4.2.2. Procesamiento de las muestras para tinciones histoquímicas

Posterior al proceso de fijación, se retiró cada muestra de su contenedor de fijación, se lavó con agua destilada y se preparó para los procesos de deshidratación, aclaramiento e infiltración de parafina. Dicha preparación se hizo cortando las biopsias a un tamaño menor (1,5cmx2cm); a las muestras correspondientes a los grupos intervención 1 o intervención 2 se les extrajo el microchip RFID pasivo y la cápsula de vidrio respectivamente y se les realizó un corte tentativo en la mitad de la posición del dispositivo, obteniendo dos partes de la biopsia para cada muestra. Este paso fue útil para poder determinar si había diferencias en el tipo de recubrimiento del microchip RFID pasivo para el caso de las biopsias de los biomodelos del grupo intervención 1, el resultado de esta preparación previa a la continuación del procesamiento se puede ver en la Figura 8. Cada biopsia fue ubicada en un casete de inclusión rotulado con el número del biomodelo y la inicial del material de revestimiento, siendo la letra “V” para el vidrio o “P” para el Parylene C®.

3.4.2.2.1. Deshidratación, aclaramiento, infiltración e inclusión

Luego de ser fijados, se deshidrataron los especímenes en un proceso donde se da la eliminación y reemplazo del agua intra e intercelular por el material en el que se

incluyó el espécimen. En el procedimiento de deshidratación se empleó un procesador automático de tejidos *Leica® TP1020®* en un tiempo aproximado de 6,5 horas, divididos en 12 estaciones: alcohol al 70% (1 inmersión), alcohol al 80% (1 inmersión), alcohol al 95% (2 inmersiones), alcohol al 100% (4 inmersiones), aclaramiento de los tejidos con xilol (2 inmersiones para extraer el alcohol y permitir que el Xilol -que es un dilusor- favorezca la penetración del medio de inclusión en los tejidos con mayor facilidad); infiltración con parafina en una temperatura de 60°C (2 estaciones)(104–106).

Finalizado el proceso de deshidratación de los especímenes, se incluyeron en paraplast *Xtra® McCormick®* (mezcla de parafinas naturales y polímeros sintéticos), con el fin de conferirle a los tejidos solidez estructural para permitir cortes muy finos. El paraplast ocupa los espacios intra e intercelulares que ocupaba el agua(104–106) En este proceso se empleó el centro de inclusión *Histocentre 3® Leica®* usando los casetes de inclusión mencionados previamente de referencia *Sakura® Paraform® M7616* y moldes metálicos *Tissue-Tek® Sakura®* comprobando que todos los módulos de trabajo estuvieran a 60°C de temperatura de trabajo.

3.4.2.2.2. Corte y montaje

Se obtuvieron 40 bloques parafinados (que representan la unidad final de análisis o el “n” de este trabajo), que se cortaron en un micrótopo semi-automático *Leica® RM 2135®* a 4µm, obteniéndose cortes seriados que se depositaron y recogieron de un baño maria *Boeckel®* a 60°C con un portaobjeto de vidrio rotulado con la codificación de cada muestra y con posterior verificación de calidad de los mismos en un microscopio de luz *Olympus® CH2®* (104–106). Finalmente, se conservaron los portaobjetos con los cortes en canastillas de acero inoxidable *Sakura® Hook® DRS601®* en una estufa *Thelco®* a una temperatura de 38°C en un periodo entre 1 y 3 días. Para cada bloque se obtuvieron 6 portaobjetos con 6-10 cortes seriados cada uno para un total estimado de 240 placas histológicas. Durante el procesamiento, tres muestras fueron descartadas por su imposible manipulación dentro del proceso de corte, por lo cual se obtuvieron finalmente 222 placas histológicas.

3.4.2.2.3. Tinciones y montaje

Cortar los tejidos en láminas delgadas permite la observación microscópica, pero pone en evidencia que dichos cortes, transparentes, carecen de color y contraste, por lo cual no se visualiza prácticamente ningún componente. Finalizado el procesamiento de los especímenes, se dividieron en mitades iguales los 222 portaobjetos, dejando 111 para teñir con Hematoxilina-Eosina y el restante con la

tinción Tricrómica de Masson (104–106). (Ver Sección de anexos: 9.2.9. Protocolo de tinción para hematoxilina eosina y 9.2.10 Protocolo de tinción para Tricrómica de Masson). Posterior a la verificación de calidad de las tinciones, hicimos el montaje con un cubreobjetos usando como medio de montaje bálsamo de Permount garantizando la cobertura total en una capa delgada sobre todo el portaobjetos y el cubreobjetos.

3.4.3. Fase III: Análisis histopatológico descriptivo

Esta fase se desarrolló en tres etapas: observación y análisis histopatológico, toma de imágenes digitales y análisis estadístico.

3.4.3.1. Observación y análisis histopatológico

Obtenidas las placas histológicas a partir de las biopsias y teñidas con los métodos de tinción de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson, se realizó una observación al microscopio óptico de luz con ayuda de la especialista en Anatomía patológica y patología clínica Nancy Vargas, dentro de la cual, se planteó la siguiente secuencia de procedimiento de observación:

- Se usó un equipo Leica DM2700 con cámara integrada para hacer las observaciones directamente.
- Se usó el equipo de cómputo DELL integrado a la cámara para hacer las observaciones proyectadas a la pantalla y estandarizar la toma de fotografías digitales.
- Por cada una de las placas histológicas, se hizo el análisis de dos formas: una descripción de cada conjunto de placas pertenecientes a cada bloque parafinado en formato de reporte histopatológico y una tabla de variables en el programa Microsoft Excel® 2016 organizada con los siguientes datos:
 - Número de biomodelo.
 - Grupo experimental.
 - Tiempo de implantación.
 - Material de recubrimiento.
 - Epidermis.
 - Dermis.
 - Presencia de inflamación del tejido adiposo.
 - Panículo carnososo.
 - Presencia de cápsula fibrosa.
 - Grosor de cápsula fibrosa.
 - Presencia de inflamación capsular.
 - Tipo de inflamación.

- Tipo de células
- RGCE secundaria a biomateriales
- Material extraño pero-implantar

Los hallazgos realizados se describían por consenso patólogo – estudiante de maestría teniendo en cuenta cada punto mencionado en la lista anterior y siguiendo la misma secuencia. Por recomendación del asesor estadístico derivado de la disponibilidad completa sobre las colecciones y la opción de que la dupla patólogo-estudiante de maestría trabajaran juntos, se decidió no hacer prueba de concordancia.

Teniendo los reportes histopatológicos diseñados, se planeó una secuencia de toma de fotografías digitales para cada una de las variables definidas, desde la región más superficial de la muestra hacia el interior, así: epidermis, dermis papilar, dermis reticular, panículo carnososo, tejido celular subcutáneo, tejido adiposo blanco (panículo adiposo parcial) tejido peri-implantar, región de implante (que corresponde al lugar donde se halló la cápsula fibrosa, siempre y cuando esta se haya formado).

En total se observaron 222 placas, 111 correspondientes a las tenidas con Hematoxilina-Eosina y 111 con Tricrómica de Masson convencional.

3.4.3.2. Toma de imágenes digitales

Se adquirieron las imágenes digitales por medio del software Leica Application Suite versión 4.7 (LASV4.7) usando los objetivos de 4X, 10X y 40X. El análisis del espesor de la cápsula fibrosa se realizó con el programa *Image Pro plus*. Previo a la toma de imágenes digitales por medio del microscopio Leica DM2700 con cámara integrada, se debió hacer los ajustes de los parámetros de:

- Calibración blancos: Ajuste automático asistido por el programa, optimizando este ajuste llevando el plano de enfoque de la cámara a una región sin muestra y de fondo blanco para acercarse al mejor ajuste de blancos posible.
- Intensidad de luz: De acuerdo al objetivo.
- Exposición: Se manejó un promedio de exposición de 136,7ms para los objetivos 4X, 10X y 40X.
- Ganancia: Se dejó la cantidad de ganancia en 2,7x para los objetivos 4X, 10X y 40X.
- Saturación: Se ubicó el parámetro de saturación en 1,20 para los objetivos 4X, 10X y 40X.

- Gamma: No se modificó el gamma, dejándolo en 0,70 para los objetivos 4X, 10X y 40X.

Parámetros como el histograma o canales de luz no fueron modificados por los observadores, y todo el proceso se realizó en el programa LASV4.7. El ajuste descrito anteriormente permitió que las imágenes conservaran el mayor nivel de fiabilidad en proporciones para poder hacer mediciones en el programa de análisis de imágenes, además de mejorar las características gráficas para fines de re-análisis y uso en publicaciones sean éstas presentaciones orales, poster o trabajos originales en revistas de investigación.

Para algunas de las placas histológicas se usó el módulo “Image Buldier” del programa LASV4.7 para hacer reconstrucciones automáticas de las placas con imágenes capturadas en tiempo real con los objetivos de 10x y 40x.

3.4.3.2.1. Medición del grosor de cápsulas fibrosas

Para la medición del grosor de las cápsulas fibrosas se utilizó el programa Image Pro Plus Versión 7.0, en donde cuatro fotos de campos diferentes de una misma cápsula fueron medidos y se determinó el promedio grosor para cada una de ellas utilizando la herramienta longitud. En aquellos lugares donde quedaban espacios en blanco, estos se medían y eran restados a la longitud inicial que arrojaba la herramienta. Todas las medidas fueron registradas en pixeles con la equivalencia a micras, haciendo la calibración con una reglilla milimetrada para el objetivo de 40X. (Ver sección de anexos: 9.2.12. Protocolo de mediciones para grosor de cápsula fibrosa).

3.4.3.3. Análisis estadístico a priori

Se planteó que el análisis de los resultados se haría mediante el uso del programa Stata 13.0, además, un análisis exploratorio de los datos con el fin de identificar la distribución de las variables cuantitativas y la frecuencia de las cualitativas. Se planteó examinar además los valores extremos (outliers) para determinar su manejo en caso de requerir la eliminación de estos registros, y para verificar errores en la observación o en la cuantificación.

En el análisis univariado se determinaría la frecuencia para las variables cualitativas, y para las cuantitativas se encontrarán sus medidas de tendencia central y dispersión, como el promedio y la desviación estándar en las que presenten distribución normal, y mediana con su rango intercuartílico en las que no se distribuyan de modo normal.

Para el análisis bivariado, se compararían las variables dependientes entre los grupos mediante la prueba estadística de χ^2 o Fisher según corresponda. Para

las variables cuantitativas se compararían los promedios o medianas según la distribución de las variables y se realizarían pruebas de hipótesis para verificar la igualdad de promedios (prueba T o ANOVA si hay distribución normal o en su defecto, la prueba de Wilcoxon). El nivel de significancia sería establecido en $p < 0.05$.

3.4.3.4. Análisis estadístico a posteriori

El análisis *a posteriori* se definió haciendo el análisis univariado donde se determinó para las variables cuantitativas sus medidas de tendencia central y dispersión, como el promedio y la desviación estándar. El análisis bivariado se hizo teniendo en cuenta la variable “Tiempo de implantación” y la variable “Grupo de estudio” por medio del test exacto de Fisher. En la variable “grosor de cápsula fibrosa” se utilizó la prueba de Shapiro Wilks para determinar el cumplimiento de los principios de normalidad y posterior, se usaron los test de Mann Whitney y Kruskal Wallis. Se definió que existirían diferencias estadísticas a un valor $p < 0.05$.

3.4.4. Codificación de variables

La codificación de las variables se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla 8. Categorización de las variables					
Nombre		Definición	Tipo	Escala de medición	Indicador
Grupo de estudio		Variable independiente	Nominal	Cualitativa	Intervención 1, intervención 2 y control histológico
Tiempo de implantación		Variable independiente	Discreta	Cuantitativa	2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses
Cápsula fibrosa		Variable dependiente	Nominal	Cualitativa	Presente - Ausente
Grosor de cápsula fibrosa		Variable dependiente	Continua	Cuantitativa	Micras
Presencia de Infiltrado inflamatorio peri-capsular		Variable dependiente	Nominal	Cualitativa	Presente - Ausente
Tipo de infiltrado inflamatorio		Variable dependiente	Nominal	Cualitativa	Agudo leve, agudo moderado,

peri-capsular

Morfología epidérmica	Variable dependiente	Nominal	Cualitativa	agudo severo, crónico leve, crónico moderado, crónico severo.
Morfología dérmica	Variable dependiente	Nominal	Cualitativa	Normal, alterada
Tipo de músculo en el panículo carnososo	Variable dependiente	Nominal	Cualitativa	Normal, engrosada
Material peri-implantar	Variable dependiente	Nominal	Cualitativa	Musculo estriado esquelético, músculo liso
				Cualquier tipo de material extraño peri-implantar que se vea alrededor de la cápsula como por ejemplo, gránulos de hemosiderina.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis univariado para la determinación de frecuencias relativas y absolutas para cada variable de estudio

En total fueron procesados los 28 biomodelos en las fechas establecidas para cada grupo durante un periodo de 13 meses a partir de la fecha de solicitud al Bioterio de la Facultad de Salud, de los cuales se recolectaron 40 bloques parafinados que constituyeron la unidad de análisis (n) a partir de los que se derivaron los siguientes resultados. Por dificultades técnicas (fallo en el proceso de corte en micrótopo posterior a un proceso retrogrado de re-inclusión) en el procesamiento de los bloques parafinados correspondientes a las muestras 2V, 10V y 12V, el n se redujo a 37.

El 100% de los microchips RFID pasivos utilizados en este estudio funcionó al momento de utilizar el escáner de identificación.

4.1.1. Unidades muestrales según el grupo de estudio y el tiempo de duración de la exposición/implantación

Grupo	Tiempo (meses)				Total	Porcentaje
	2	4	6	8		
I1	6	6	6	6	24	60.00
I2	3	3	3	3	12	30.00
CH	1	1	1	1	4	10.00
Total	10	10	10	10	40	100.00

Tabla 9. Distribución del n en los tres grupos de estudio definidos y en los grupos de tiempo definidos. **I1:** Intervención 1;; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico

Para los cuatro grupos de tiempo definido en meses, se tuvo una distribución igual entre los tres grupos de estudio. Todos los biomodelos soportaron el proceso de implantación/punción y sobrevivieron el tiempo determinado aleatoriamente. Cabe recordar que el número establecido en cada grupo de estudio corresponde a los bloques parafinados obtenidos después del procesamiento histoquímico de las biopsias de los 28 biomodelos.

4.1.2. Unidades muestrales según el grupo de estudio y el tipo de material de revestimiento

Grupo	Material de revestimiento				Total	Porcentaje
	Mic/Pary	Mic/Vidrio	Vidrio	Ninguno		
I1	12	12	0	0	24	60.00
I2	0	0	12	0	12	30.00
CH	0	0	0	4	4	10.00
Total	12	12	12	4	40	100.00

Tabla 10. Material de revestimiento según grupo de estudio. **I1:** Intervención 1;; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico; **Mic/Pary:** Microchip región con Parylene C®; **Mic/Vidrio:** Microchip región con vidrio

Se observó que el grupo Intervención 1 quedó con 24 bloques parafinados dado que cada biopsia fue cortada en la zona de interfase estimada del microchip RFID pasivo donde coincide el recubrimiento polimérico y la zona desnuda que es de vidrio inerte. Esto permitió hacer comparaciones dentro del grupo intervención 1 que permitieran establecer diferencias entre la naturaleza del material de superficie dentro de un mismo dispositivo, como se mostrará más adelante.

4.1.3. Cambios en la piel de la rata Wistar

4.1.3.1. Cambios en la epidermis

Epidermis	Frecuencia	Porcentaje	Acumulado
Sin alteraciones	37	100.00	100.00
Alterada	0	0	100.00
Total	37	0	

Tabla 11. Estado morfológico de la epidermis

En ninguna de las muestras evaluadas se observaron diferencias estructurales microscópicas a nivel de la epidermis (Figura 11). El indicador “sin alteraciones” se refiere a que la epidermis (capa epitelial superficial de la piel) no presentaba cambios como: acantosis focal o generalizada, acantólisis, disqueratosis, espongiosis, hiperqueratosis paraqueratótica, variaciones melanocíticas, hiper o hipogranulosis, edema hidrópico, pérdida o alisamiento de la unión dermo-epidérmica, displasia epidérmica, metaplasia epidérmica o neoplasia epidérmica. El patrón de normalidad de la epidermis se pudo establecer a partir de las exploraciones iniciales en biomodelos que no pertenecieron a la muestra de este estudio y a los reportes descritos en la literatura mencionados en la sección “**1.6. Piel en mamíferos como humanos y roedores (ratones y ratas)**”.

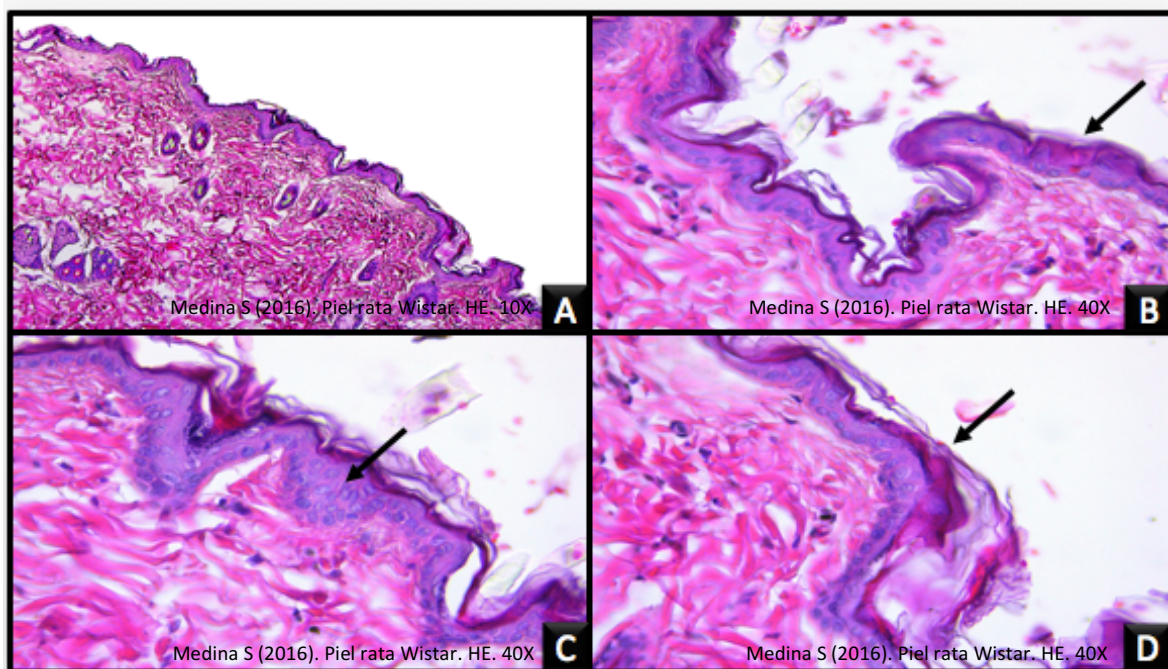


Figura 11. Características de la epidermis de una muestra correspondiente al grupo Intervención. Se observa que la epidermis conforma una capa de apariencia unilamelar pero que puede mostrar estratificación en algunos planos, constituyendo un típico epitelio plano estratificado queratinizado (Flechas). Todas las imágenes son mostradas en la tinción de Hematoxilina – Eosina. Objetivo 10X: A; Objetivo 40X: B, C, D.

4.1.3.2. Cambios en la dermis

Dermis	Frecuencia	Porcentaje	Acumulado
Sin alteraciones	4	10.81	10.81
Alterada	33	89.19	100.00
Total	37	100.00	

Tabla 12. Estado morfológico de la dermis

Casi el 90% de las muestras evaluadas mostraron cambios en la dermis que se profundizarán en el apéndice de discusión. En la rata Wistar se observa que la dermis presenta una pequeña porción de dermis papilar, difícil de discriminar, con un gran grosor de dermis reticular, de fibras principalmente delgadas con un tipo de tejido conectivo denso irregular (Figura 12). El indicador “alterada” a que la dermis podría presentar cambios como: papilomatosis, fibrosis evidenciada como aumento del componente fibrilar o en cambios en el tamaño de las fibras del tejido conectivo. Dichos cambios eran más evidentes de observar en las placas teñidas con la tinción Tricrómica de Masson, pero en Hematoxilina – Eosina también se podía apreciar un

aumento de la acidofilia (Figura 13). El patrón de normalidad de la dermis se pudo establecer a partir de las exploraciones iniciales en biomodelos que no pertenecieron a la muestra de este estudio y a los reportes descritos en la literatura mencionados en la sección **“1.6. Piel en mamíferos como humanos y roedores (ratones y ratas)”**.

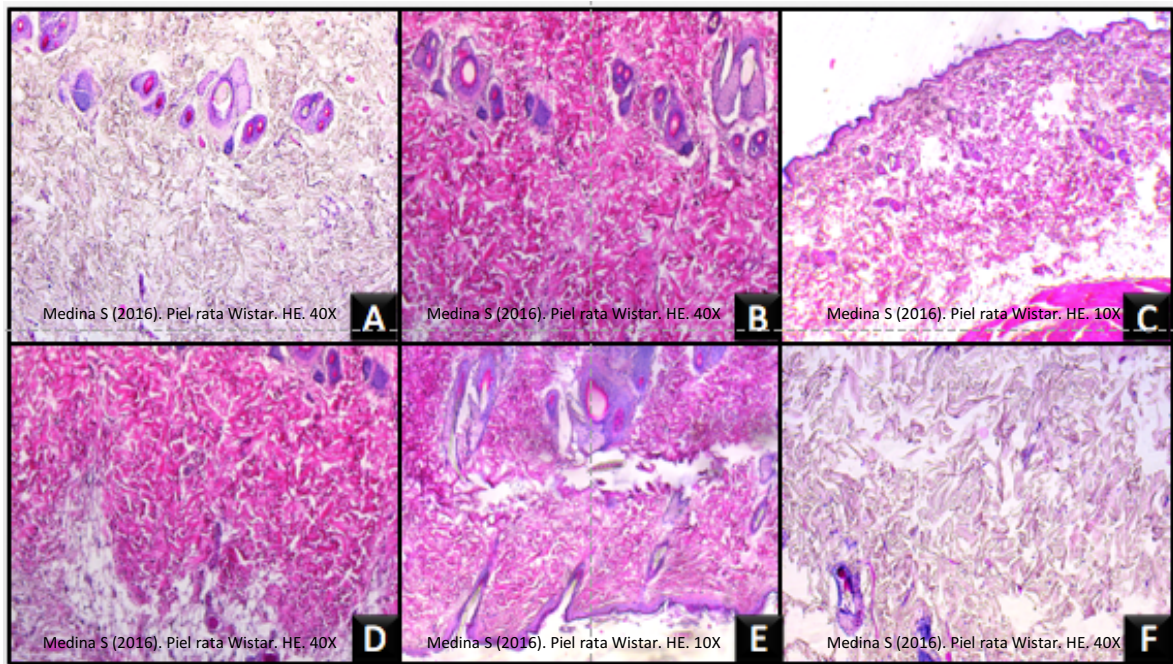


Figura 12. Se observan imágenes correspondientes a la dermis en las muestras de piel de rata Wistar teñidas con Hematoxilina Eosina. Por lo general se puede ver una mayor acidofilia que podría corresponder a un aumento en el componente fibrilar de la matriz extracelular correspondiente a la dermis reticular. En las regiones profundas se puede observar una menor intensidad de la tinción acidófila (Imágenes A y F). En algunas de las muestras se podía encontrar una pérdida de la aparente cohesión que hay del tejido conectivo denso irregular dérmico, durante la inclusión en el baño maría, todos los cortes correspondientes a los bloques parafinados del grupo Intervención, presentaron abombamiento y en algunos casos estallamiento, lo que hacía difícil su obtención y manejo (Imágenes C, E). Objetivo 10X: C, E; Objetivo 40X: A, B, D, F. La imagen C y F corresponden a cortes de piel de rata Wistar del grupo intervención 1, los que mostraron en el análisis microscópico, mayores regiones de luz entre el tejido conectivo y un aumento de la acidofilia del componente fibrilar del tejido conectivo.

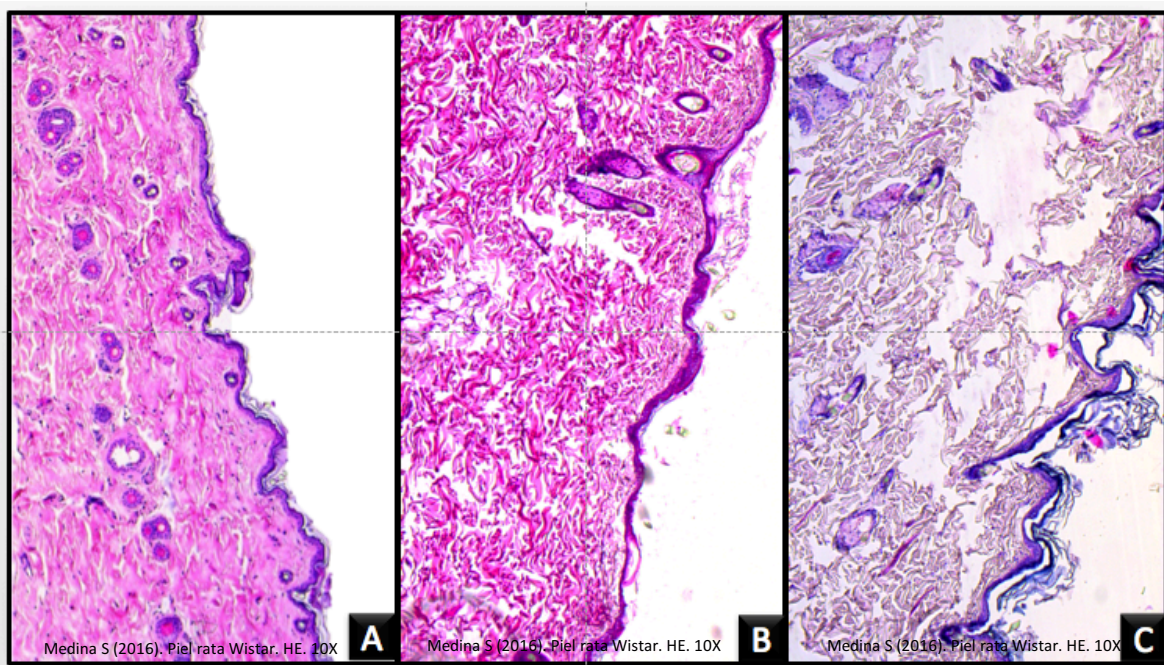


Figura 13. Recuadro comparativo entre grupos de estudio. Se muestra el contraste frente al patrón de normalidad (Imagen A) frente a los grupos Intervención 2 (imagen B) e intervención 1 (imagen C). Se puede apreciar la discontinuidad y desarreglo de las regiones de dermis reticular que se da en los grupos intervención 1 e intervención 2. Objetivo 10X: A, B, C.

4.1.3.3. Características del tejido adiposo presente en el tejido celular subcutáneo y presencia de inflamación intra-tisular

Inflamación tejido adiposo	Frecuencia	Porcentaje	Acumulado
Presente	0	0	0
Ausente	37	100.00	100.00
Total	37	100.00	

Tabla 13. Inflamación en tejido adiposo

Se encontró que todos los sujetos de estudio no presentaron signos de inflamación intra-tisular a nivel del tejido adiposo que se encuentra en el tejido celular subcutáneo. Este tejido tenía una representación de tejido adiposo blanco (unilocular) conformando amplios panículos adiposos o también, se lograron ver inclusiones de tejido adiposo pardo en algunos de los especímenes. Este punto fue tenido en cuenta, recordando que dicha región puede coincidir con la zona de implantación de un microchip RFID pasivo, y de esa forma, el tejido adiposo (sea blanco o pardo), sufrir modificaciones por la presencia de dicho cuerpo extraño (Figura 14).

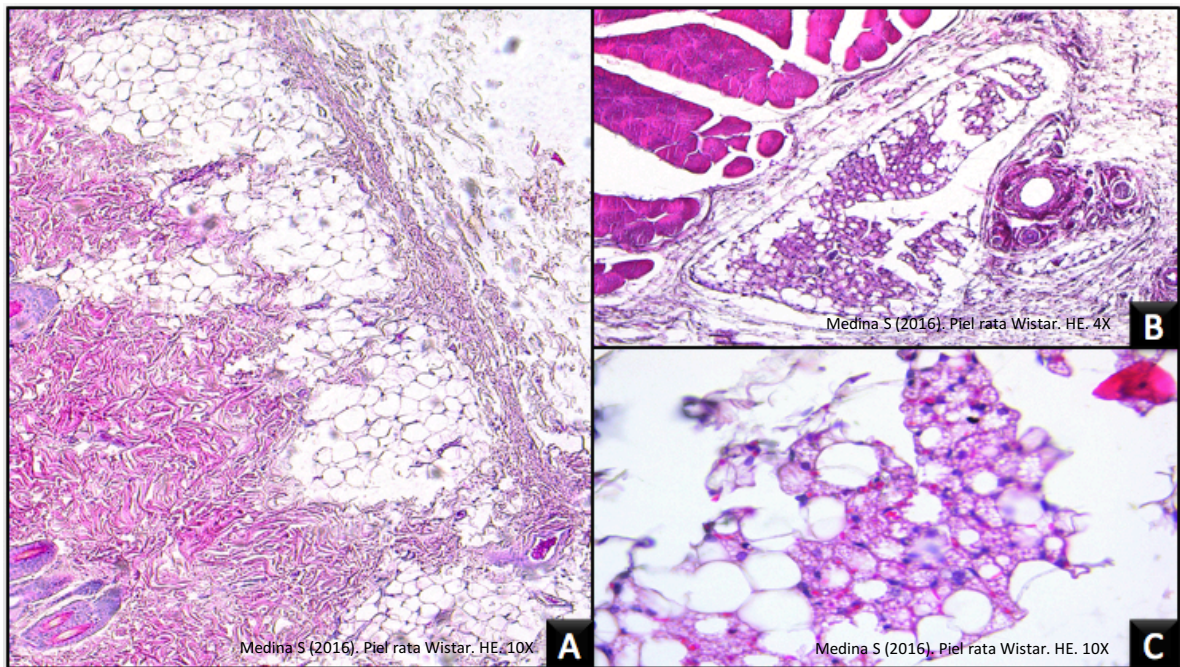


Figura 14. Panículos adiposos como parte del tejido celular subcutáneo. Se muestra la extensión generalizada del tejido adiposo en el tejido celular subcutáneo (Imagen A) y la existencia de tejido adiposo pardo en la región interescapular (imagen B y C) No se observan infiltrados celulares que sugieran una respuesta inflamatoria de tipo agudo o crónico existente. Objetivo 4X: B; Objetivo 10X: A; Objetivo 10X: C.

4.1.3.4. Características histológicas del panículo carnoso

Esta estructura que se ubica dentro del tejido celular subcutáneo o por encima de este, tenía una representación histológica de tejido muscular estriado esquelético típico para todos los sujetos de estudio. Para los grupos de estudio esta estructura era un lugar de referencia importante dado que por encima o por debajo de este se podía encontrar el lugar final de implantación que coincidía con la aparición de la cápsula fibrosa. Eventualmente podría darse un solapamiento entre el tejido conectivo que constituye el epimisio de este músculo con el tejido conectivo pericapsular presente en aquellos especímenes que desarrollaron una cápsula fibrosa.

4.1.4. Generación histológica de una cápsula fibrosa

4.1.4.1. Presencia o ausencia de una cápsula fibrosa derivada del proceso de implantación/punción en región subcutánea interescapular y distribución en cada grupo

Cápsula fibrosa	Frecuencia	Porcentaje	Acumulado
Presente	25	67.57	67.57
Ausente	12	32.43	100.00
Total	37	100.00	

Tabla 14. Determinación de la presencia o ausencia de una cápsula fibrosa

Se encontró en casi el 70% de la muestra, la presencia de una estructura fibrilar continua o interrumpida, de forma oval-irregular y grosor variable, compuesta por células en forma de huso, alargadas de límites poco distinguibles compatibles con fibroblastos y aparentemente infiltradas por células mononucleares y en algunos casos polimorfonucleares. Un hallazgo relevante de esta cápsula, que formaba un tejido con características de ser tejido conectivo denso irregular, era la variable cantidad de capilares intra-capsulares que eran apreciables. Otra característica a tener en cuenta que no fue objetivo de este estudio, es que dicha cápsula se pudo encontrar por encima (dermis reticular) o por debajo (tejido celular subcutáneo) del panículo carnoso. El indicador “ausente” se refiere a que no se encontraron estructuras con características similares a las descritas previamente a lo largo de las muestras en cada uno de los cortes seriados evaluados (Figuras 15 a 21).

Grupo	Material			Total
	Mic/Pary	Mic/Vidrio	Vidrio	
I1	11	7	0	18
I2	0	0	7	7
CH	0	0	0	0
Total	11	7	7	25

Tabla 15. Distribución por grupos de la aparición de una cápsula fibrosa. **I1:** Intervención 1;; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico; **Mic/Pary:** Microchip región con Parylene C®; **Mic/Vidrio:** Microchip región con vidrio

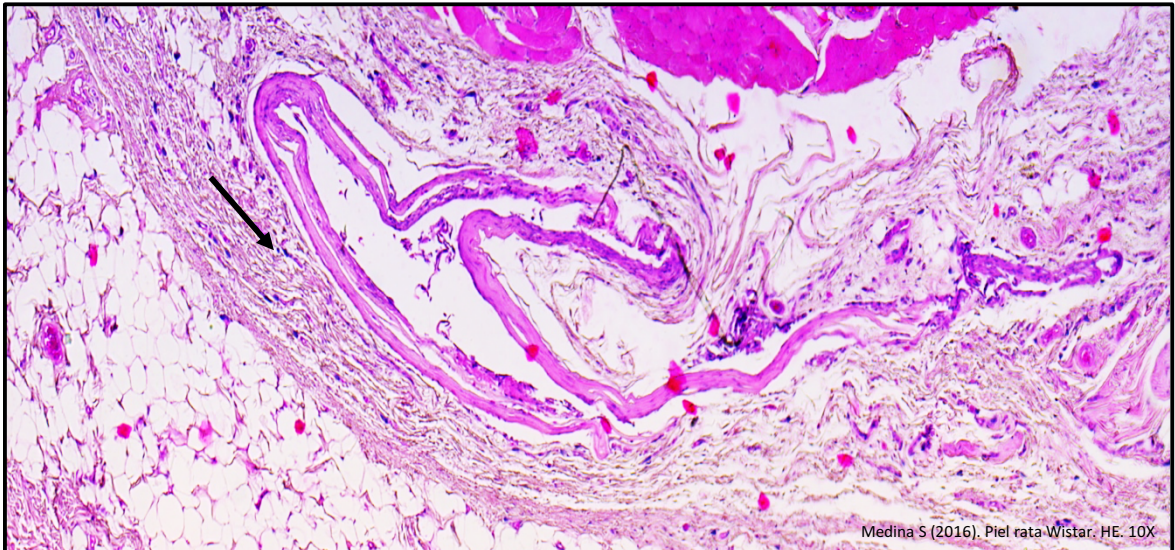


Figura 15. Muestra de piel del grupo I1 teñida con Hematoxilina-Eosina donde se observa presencia de estructura acidófila continua compatible con una cápsula fibrosa. Reconstrucción asistida con el módulo Image Buldier del programa LASV4.7. Flecha=Tejido peri-implantar. Objetivo 10X.

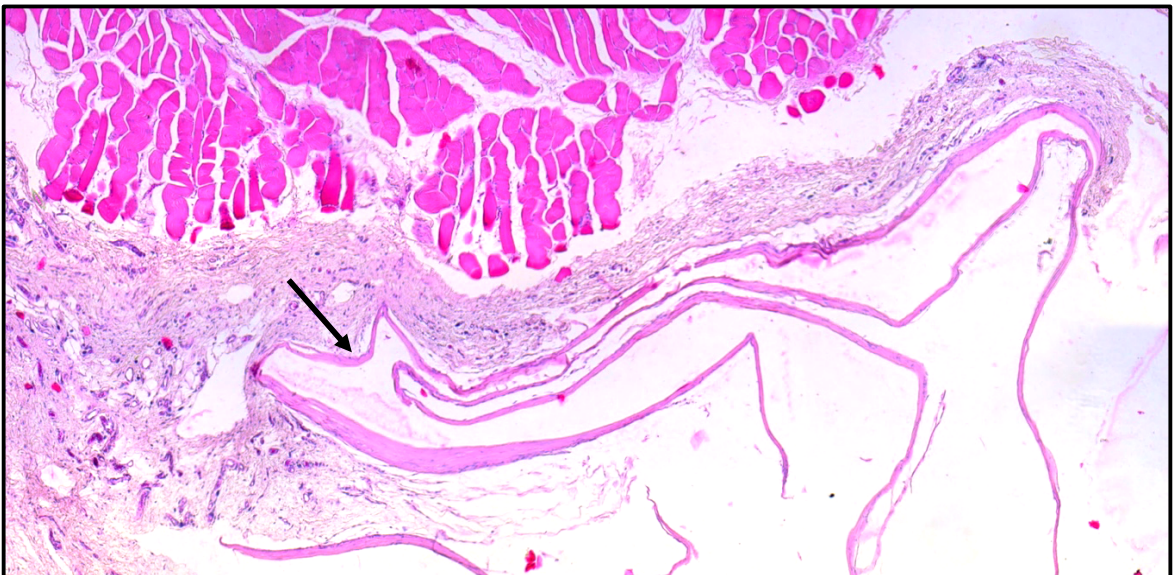


Figura 16. Muestra de piel del grupo I1 teñida con Hematoxilina-Eosina donde se observa presencia de estructura acidófila continua compatible con una cápsula fibrosa, comparar el tejido que rodea a la cápsula fibrosa como varía en características entre muestras, esta es la región denominada tejido peri-implantar (flecha). Reconstrucción asistida con el módulo Image Buldier del programa LASV4.7. Objetivo 10X.

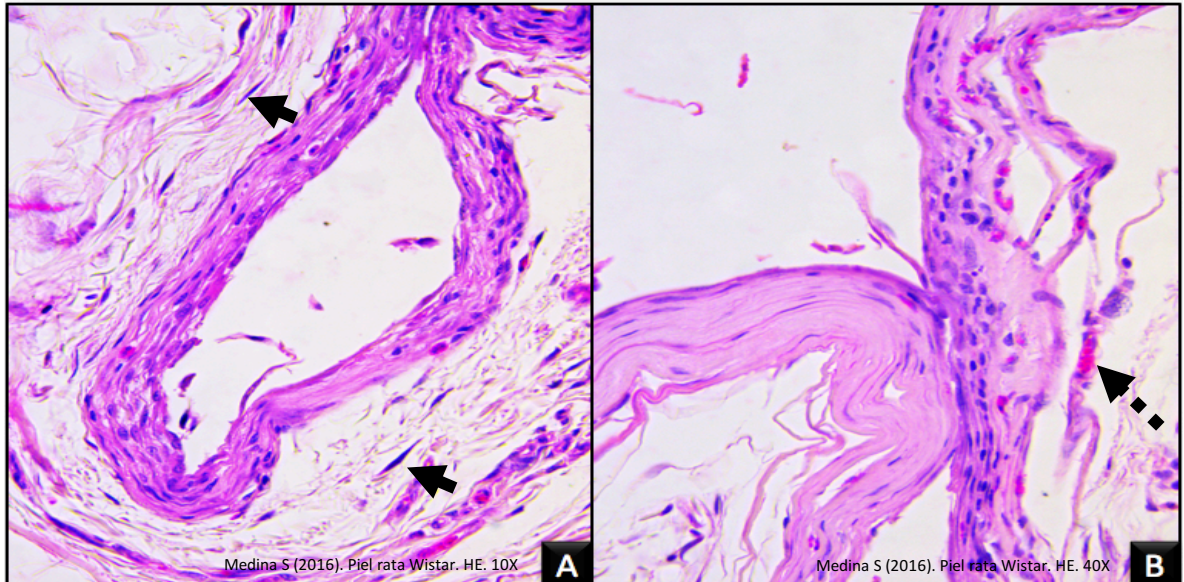


Figura 17. Se puede apreciar la alta celularidad infiltrada dentro de la cápsula fibrosa, con células compatibles a linfocitos. Se distingue por debajo de la cápsula, células fusiformes, separadas, compatibles con fibroblastos (flecha continua), e igualmente aparición de capilares en la región peri-implantar (flecha discontinua). Objetivos= 10X(Imagen A): 40X (Imagen B).

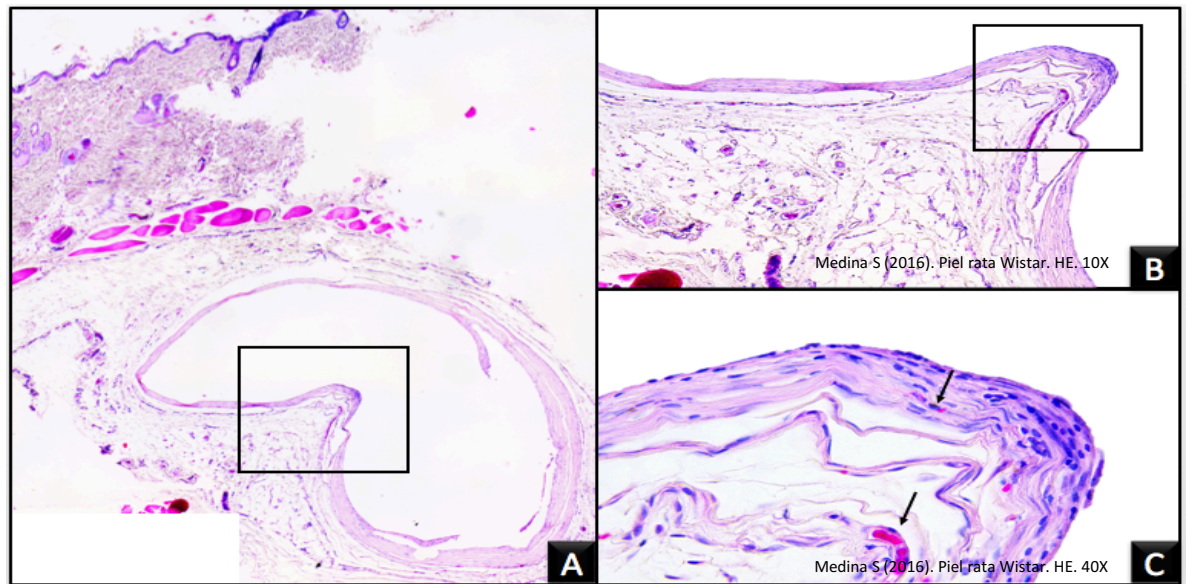


Figura 18. Muestra 3V6M (Grupo I1). Se aprecia reconstrucción digital (Imagen A) con una región de interés con alta celularidad intra-capsular (recuadros en A y B). Se observa presencia de capilares intracapsulares y pericapsulares (flechas). Objetivo 10X: A y B; Objetivo 40X: C.

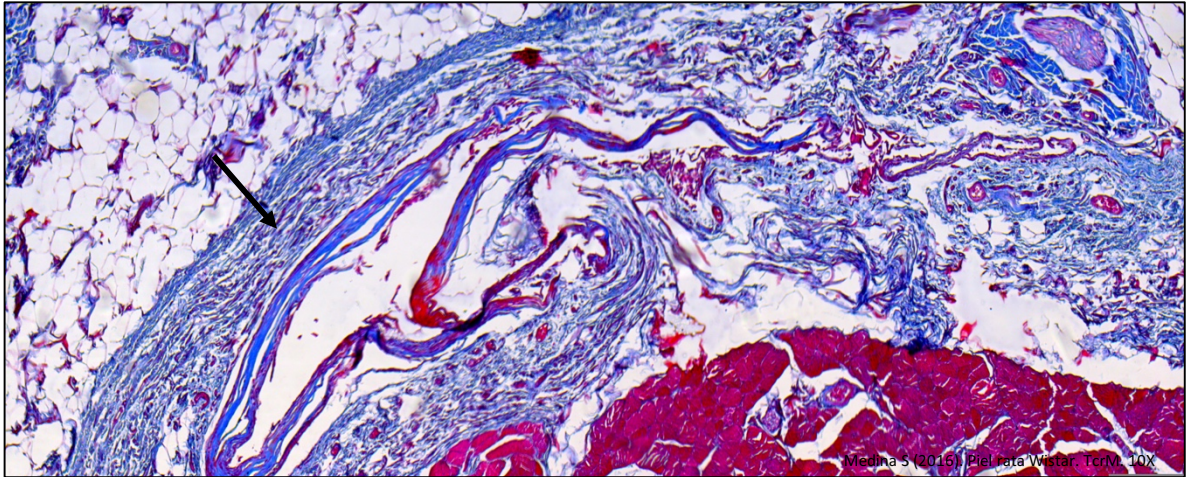


Figura 19. Muestra 11P6M (Grupo I1) teñida con la tinción Tricrómica de Masson. Reconstrucción asistida con el módulo Image Buldier del programa LASV4.7. Flecha=Tejido peri-implantar. Objetivo 10X. Flecha=Tejido peri-implantar. Objetivo 10X.

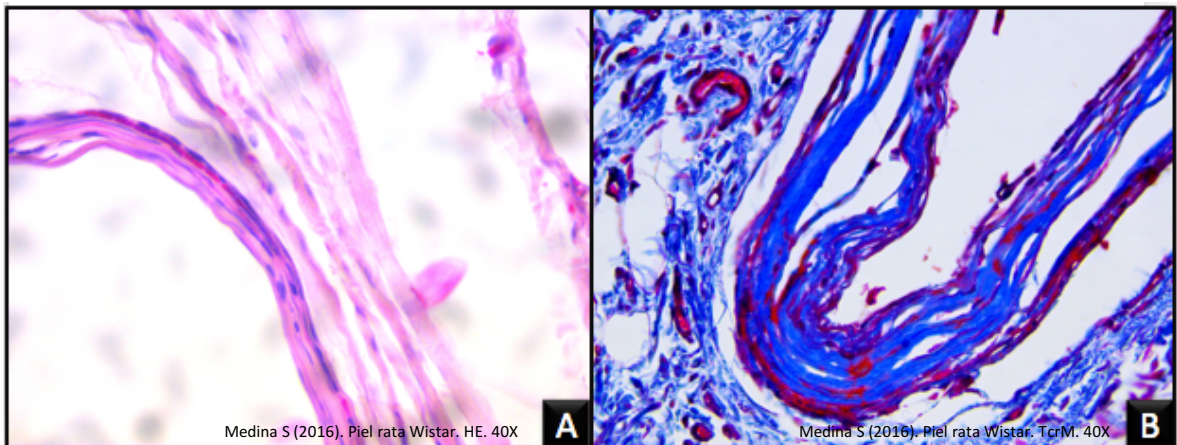


Figura 20. Comparación de tinción entre cápsula fibrosa teñida con Hematoxilina-Eosina (A) con una teñida con Tricrómica de Masson (B). Se observa que aumenta la intensidad del colorante dentro de la cápsula, esto podría indicar de la presencia de un colágeno fibrilar maduro. Objetivo 40X: A y B.

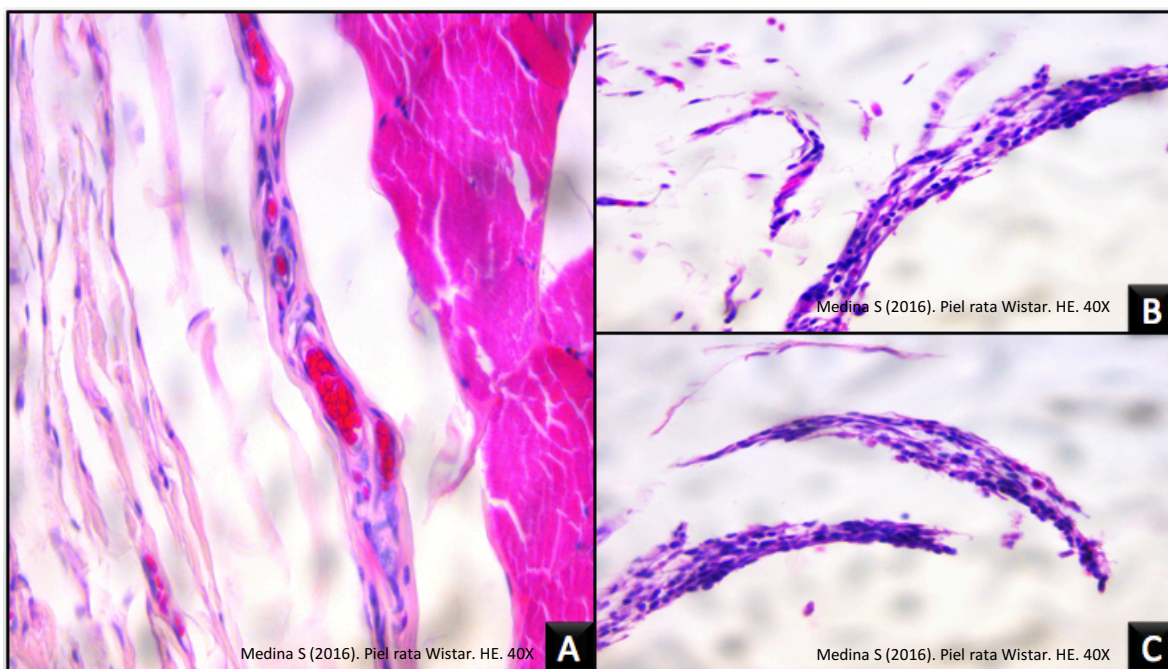


Figura 21. Hallazgos dentro de la cápsula fibrosa. Se puede observar el desarrollo de una capilarización intracapsular (Imagen A) y un aumento de la celularidad de la misma (Imagen B y C). Objetivos 40X: A, B, C.

4.1.4.1.1. Medidas de grosor de las cápsulas fibrosas

Se empleó la herramienta de medición integrada al Software LASV.4.7 para medir el grosor de cada una de las cápsulas de vidrio identificadas sobre fotografías tomadas en un aumento de 40X. Para la calibración de la herramienta de medición, fue necesario ajustar los parámetros ajustables de los aditamentos del microscopio como lo son: la referencia del cabezal (Para el microscopio DM 2500), la referencia del objetivo (4X:13613240 4X/0.1 PLAN; 10X:13613241 10X/0.22 PLAN; 40X:13613242 40X/1.25 PLAN) y la referencia de la cámara para poder tener una medición real y reproducible. Por cada una de las cápsulas fibrosas se tomaron cuatro medidas en puntos diferentes y se calculó el promedio de dicha medición, en la siguiente tabla, solo se muestran los promedios por cada medición:

#	Grupo material	Grosor (μm)	#	Grupo material	Grosor (μm)
1	Microchip-Parylene	170,3125	11	Microchip-Parylene	192,4
1	Microchip-Vidrio	155,345	11	Microchip-Vidrio	178,7
2	Microchip-Parylene	173,5	12	Microchip-Parylene	153,52
2	Microchip-Vidrio	No aplica	12	Microchip-Vidrio	No aplica
3	Microchip-Parylene	316,3	13	Vidrio	192,3
3	Microchip-Vidrio	223,25	14	Vidrio	No aplica
4	Microchip-Parylene	206,9	15	Vidrio	109,03
4	Microchip-Vidrio	189	16	Vidrio	No aplica
5	Microchip-Parylene	185,472	17	Vidrio	159,8
5	Microchip-Vidrio	No aplica	18	Vidrio	189,875
6	Microchip-Parylene	126,5	19	Vidrio	No aplica
6	Microchip-Vidrio	108,5	20	Vidrio	120,9
7	Microchip-Parylene	157,6	21	Vidrio	No aplica
7	Microchip-Vidrio	No aplica	22	Vidrio	No aplica
8	Microchip-Parylene	155,349	23	Vidrio	121,23
8	Microchip-Vidrio	110,1	24	Vidrio	134,35
9	Microchip-Parylene	221,05	25	No cápsula	No aplica
9	Microchip-Vidrio	218,775	26	No cápsula	No aplica
10	Microchip-Parylene	No aplica	27	No cápsula	No aplica
10	Microchip-Vidrio	No aplica	28	No cápsula	No aplica

Tabla 16. Mediciones de grosor de cápsula (μm) por muestra

4.1.4.1.2. Estimación del promedio del grosor de las cápsulas fibrosas entre el universo y para cada uno de los grupos

Variable	Obs	Promedio(μm)	DE	Min	Max
Grosor	25	170.8023	46.83805	108.5	316.3

Tabla 17. Promedio del grosor de las cápsulas fibrosas entre todos los sujetos con presencia de cápsula. Obs: Observados; DE: Desviación Estándar; Min: Mínimo; Max: Máximo

En promedio se pudo establecer que el grosor de la cápsula fibrosa para todos los sujetos estudiados que presentaron dicha cápsula, fue de $171\mu\text{m} \pm 47$. Complementa la Figura 22.

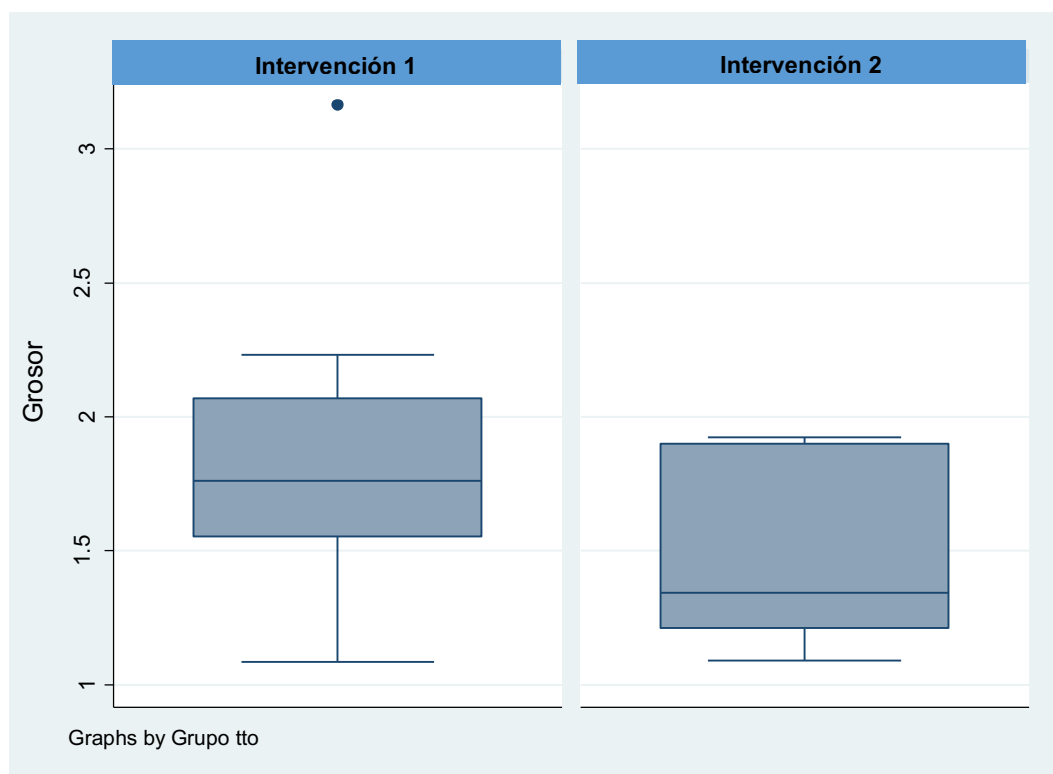


Figura 22. Representación gráfica de promedio de grosor de cápsula para los grupos intervención.

Grupo	Obs	Promedio(μm)	EE	IC95%
I1	18	180.143	11.43918	156.5337 – 203.7523
- Mic/Parylene	11	187.173	15.19961	153.3062 – 221.0399
- Mic/Vidrio	7	169.0957	17.74861	125.6664 – 212.525
I2	7	146.7836	12.91079	120.137 – 173.4301
- Vidrio	7	146.7836	12.91079	115.192 – 178.3751

Tabla 18. Promedio del grosor de la cápsula fibrosa para los grupos de estudio y detalle por grupo. EE: Error Estándar; IC95%: Índice de confianza del 95%. **I1:** Intervención 1;; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico; **Mic/Pary:** Microchip región con Parylene C®; **Mic/Vidrio:** Microchip región con vidrio.

Los promedios arrojados para cada grupo se encuentran dentro del promedio general teniendo en cuenta su DE. Contrastando los promedios de los grupos Intervención 1 e Intervención 2 se puede observar que hay un promedio de grosor menor en el segundo grupo comparado con el primero. En este punto se decidió determinar si habían diferencias significativas para el grosor de la cápsula fibrosa en relación a los grupos de estudio que presentaron la formación de una cápsula fibrosa. Complementan la Figura 23 y 24.

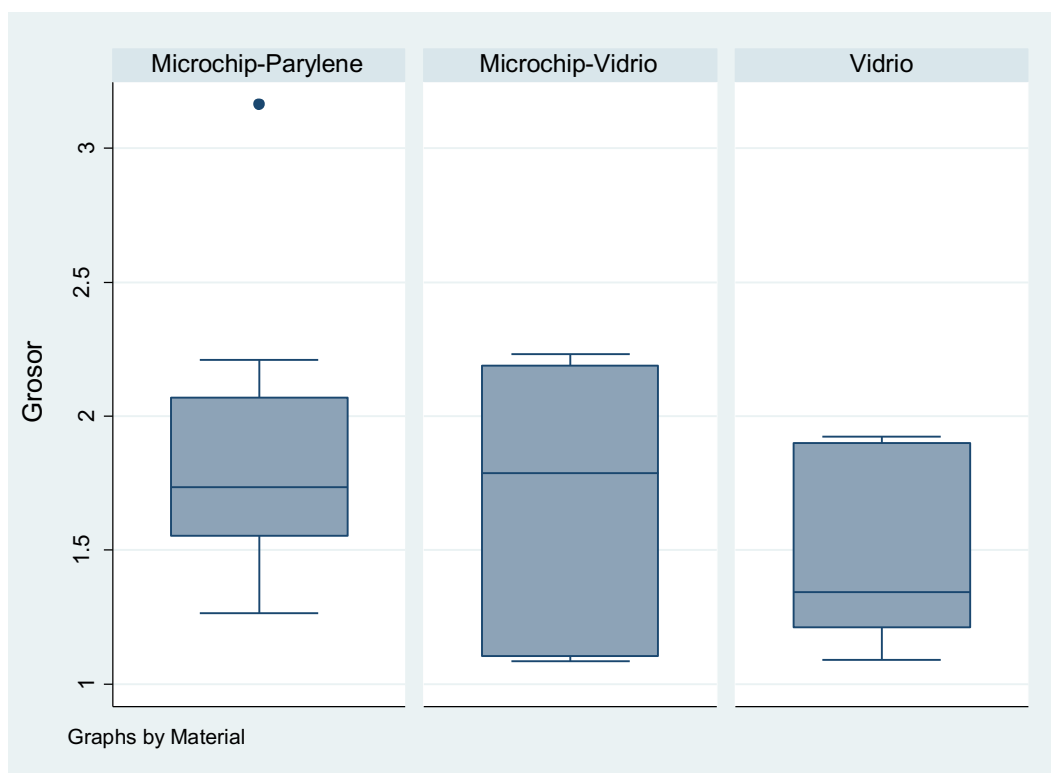


Figura 23. Representación gráfica de promedio de grosor de cápsula para todos los grupos de estudio.

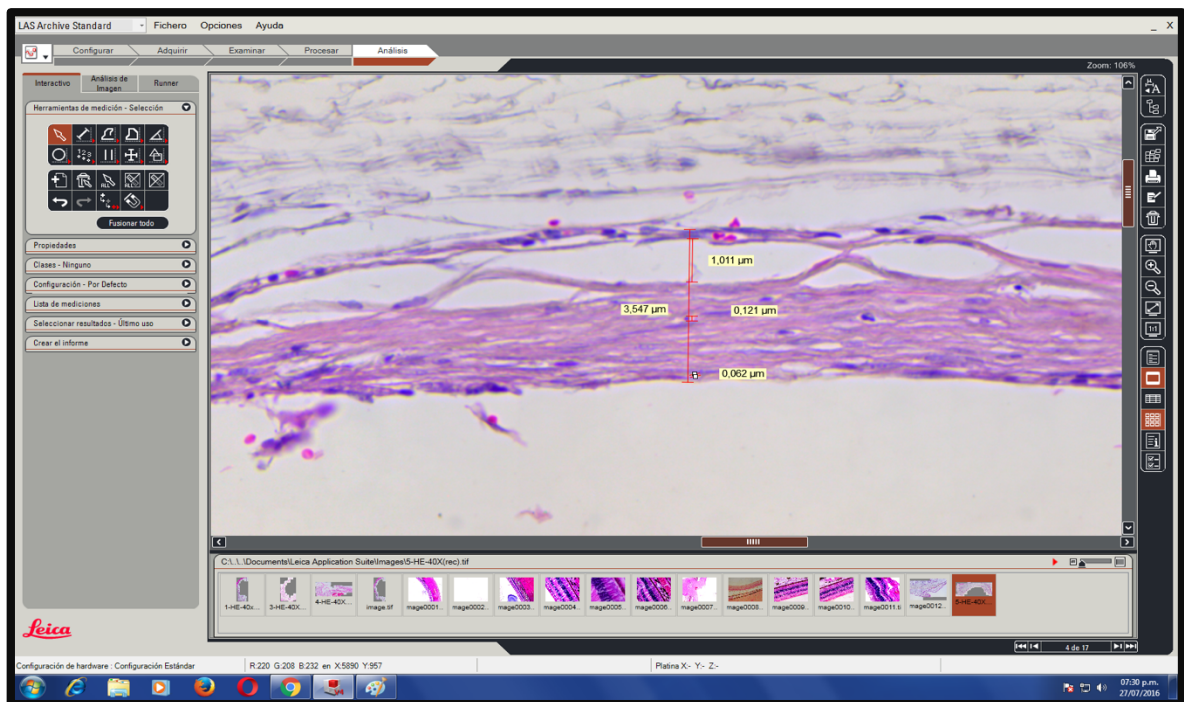


Figura 24. Medición por medio de análisis de imágenes de cápsulas fibrosas asociadas a cuerpo extraño. Para las regiones en blanco intra-capsulares, se hacía la medición del espacio y se restaba a los límites visibles de la cápsula.

4.1.4.1.3. Determinación de las diferencias entre grupos a partir de la comprobación de los supuestos de normalidad y análisis de la variable grosor

Prueba de normalidad – Hipótesis

H0: El grupo presenta una distribución normal

Ha: El grupo no presenta una distribución normal

Antes de hacer las pruebas estadísticas de contraste de hipótesis, se hace prueba de normalidad con el fin de determinar si se puede hacer prueba 't' cuando son dos grupos, o ANOVA cuando son más de dos. En caso de que no sea normal, aplicamos Mann Whitney cuando son dos grupos y Kruskal Wallis cuando son más de dos grupos. Para verificar normalidad se aplicó la prueba Shapiro Wilks.

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Grosor	25	0.91423	2.383	1.775	0.03792

Tabla 19. Test de Shapiro Wilks

Se observó que por el valor de p , se debe rechazar la hipótesis nula que dice que la distribución es normal. Por tanto, se aplicaron las pruebas no paramétricas para determinar diferencias del grosor de la cápsula entre grupos y entre materiales.

Realizado el test de Mann Whitney para la variable Grupo, se observó que no hay diferencias en el grosor de la cápsula fibrosa entre los grupos de experimentación ($p=0.1463$), y de igual forma el test de Kruskal Wallis mostró que no hay diferencias significativas en el grosor de la cápsula para los grupos del tipo de material de revestimiento ($p=0,2885$).

En cuanto a las variables tiempo versus grosor de la cápsula, se aplicó también el test de Kruskal Wallis, arrojando ninguna diferencia significativa entre dichas variables ($p=0,3009$).

4.1.5. Generación de una RGCE secundaria a biomateriales y estadio inflamatorio

4.1.5.1. Presencia de signos celulares de inflamación pericapsular

Inflamación peri-capsular	Frecuencia	Porcentaje	Acumulado
Presente	25	67.57	67.57
No aplica	12	32.43	100.00
Total	37	100.00	

Tabla 20. Presencia o ausencia de inflamación peri-capsular

Las frecuencias de esta variable coinciden con la variable “Presencia o ausencia de una cápsula fibrosa” dado que aquellas muestras en las que fue posible observar una cápsula fibrilar desarrollada, también se halló signos celulares de inflamación peri-capsular. Para determinar la presencia de signos celulares de inflamación se debía encontrar intracapsular o peri-capsular células de tipo polimorfonuclear (para el caso de inflamación de curso agudo principalmente neutrófilos), células mononucleares (para el caso de inflamación de curso crónico principalmente macrófagos o linfocitos) e infiltrados linfo-plasmocitarios. La presencia de alguno de los grupos mencionados anteriormente y en distribuciones diversión (focal, nodular, difusa, generalizada) era tenida en cuenta como presencia de inflamación pericapsular.

Algunos de los ejemplos para determinar la presencia o no de inflamación, se encuentran registrados en las siguientes imágenes de placas teñidas con la tinción de Hematoxilina-Eosina (Figura 25).

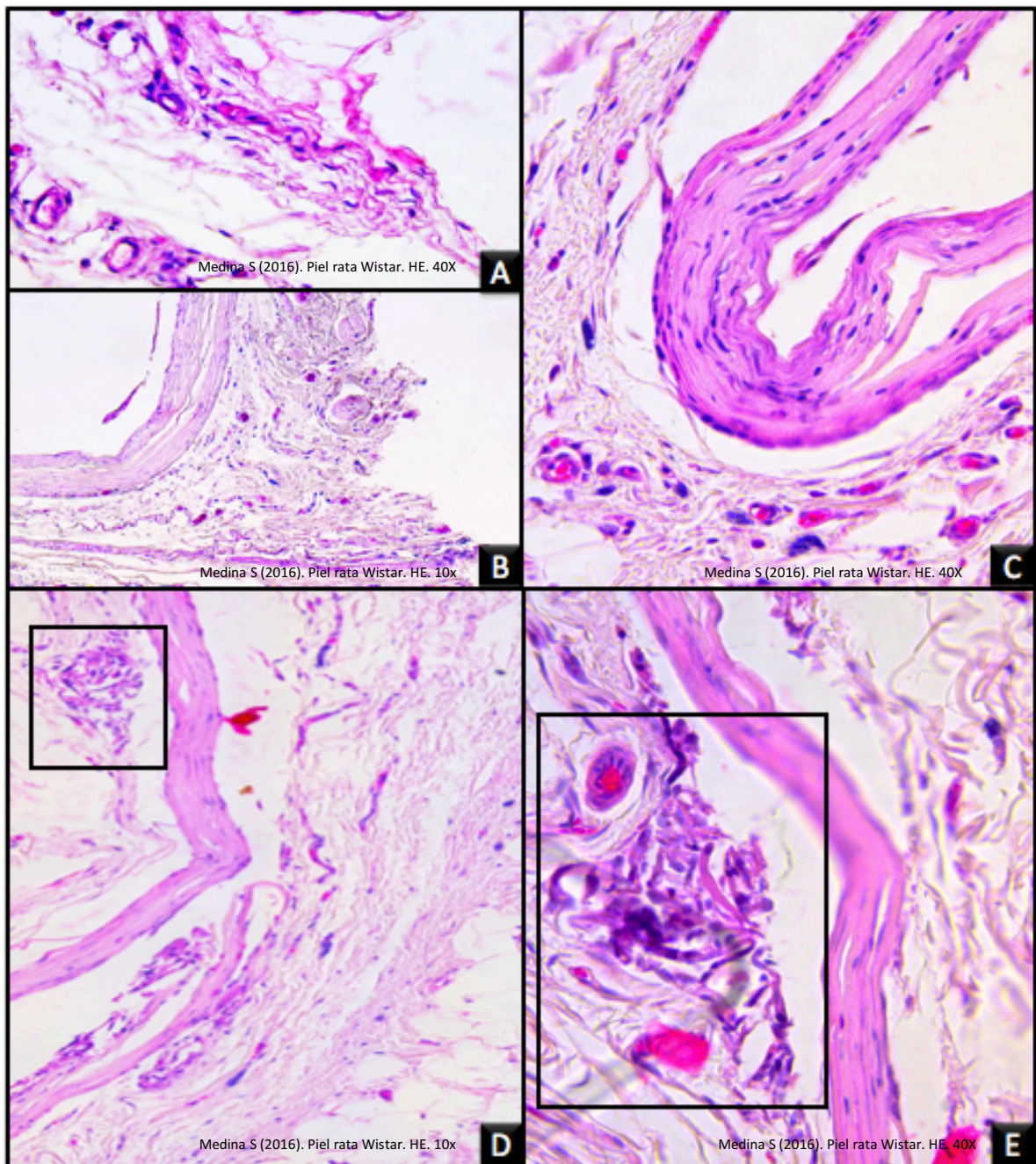


Figura 25. Se observa la diversa disposición de células con característica de infiltrados linfo-plasmocitarios en el tejido peri-implantar. Algunas de esas células rodean la vasculatura pericapsular (A y B) y se extienden en gran parte de esta región(C). El infiltrado inflamatorio puede tener disposición focal, nodular o difusa, generalizada, en las imágenes D y E se puede observar un infiltrado celular focalizado de aspecto nodular relacionado con la cápsula fibrosa (cuadro negro). Objetivo 10X: B, D; Objetivo 40X: A, C, E.

4.1.5.2. Tipo de infiltrado inflamatorio según tipo de células y distribución en la región implantar/peri-implantar

Tipo de inflamación	Frecuencia	Porcentaje	Acumulado
Crónico leve	18	48.65	48.65
Crónico Moderado	7	18.92	67.57
Crónico severo	0	0.0	67.57
No aplica	12	32.43	100.00
Total	37	100.00	

Tabla 21. Tipo de infiltrado inflamatorio

Se tuvo en cuenta los indicadores de inflamación aguda pero al no presentarse evidencia en ninguna de las muestras, no se incluyó dentro de la tabla de frecuencias. Casi en la mitad de las muestras se observaron signos de inflamación crónica de tipo leve y un porcentaje menor de signos de inflamación crónica de tipo moderado. Ninguna de las muestras mostro un infiltrado inflamatorio de tipo crónico severo. La determinación del grado de evolución del infiltrado inflamatorio (leve, moderado, severo) se estableció con base a la distribución que se observo de las células, por ejemplo, algunas muestras exhibían la presencia de un infiltrado linfoplasmocitario que no formaba grupos celulares grandes o densos dentro o alrededor de la capsula fibrosa, mientras que en otras muestras, la asociación celular existente en el infiltrado linfoplasmocitario era mayor y con más extensión dentro del tejido conectivo pericapsular.

Se pudieron observar dentro de los infiltrados inflamatorios, linfocitos dispersos, células similares a plasmocitos, macrófagos, y en menor proporción polimorfonucleares (principalmente eosinófilos). Hallazgos de células gigantes multinucleadas se realizaron en dos muestras correspondientes al grupo intervención 1 (Figura 26, Figura 29 y Figura 30). La presencia de células como eosinófilos será un punto a tratar dentro de la discusión.

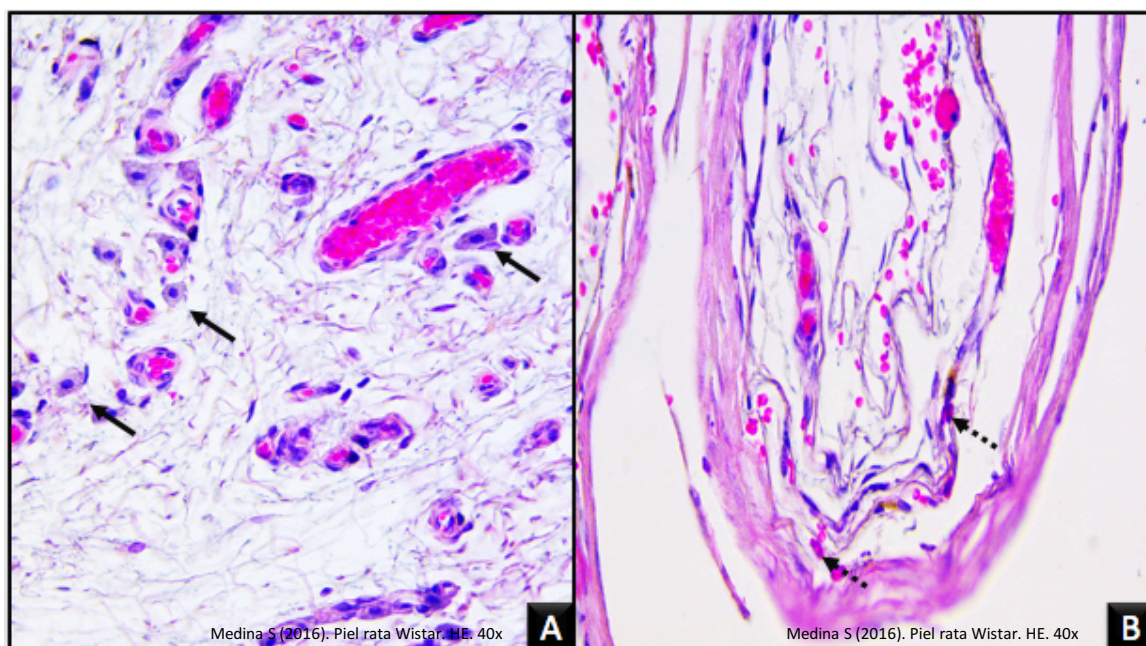


Figura 26. Células dentro de la región peri-implantar e intracapsular. Se puede observar células con características de plasmocitos (flecha negra continua) y eosinófilos (flecha discontinua). Objetivo 40X: A, B.

4.1.5.3. Evidencia de características histológicas compatibles a la formación de una RGCE secundaria a biomateriales

RGCE secundaria a biomateriales	Frecuencia	Porcentaje	Acumulado
Si	4	10.81	10.81
No	21	56.76	67.57
No aplica	12	32.43	100.00
Total	37	100.00	

Tabla 22. Presencia o ausencia de RGCE secundaria a biomateriales

Un porcentaje pequeño de la muestra total mostró el desarrollo de una reacción celular compatible a una RGCE secundaria a biomateriales; los criterios para determinar dicha compatibilidad fueron que: se encontrara un material birrefringente en el tejido conectivo peri-implantar, una formación celular compuesta principalmente por células de tipo macrófago, células epitelioides, linfocitos alrededor de dicho material birrefringente, la formación de células gigantes de cuerpo extraño. Las cuatro muestras que dieron positivo a una RGCE secundaria a biomateriales, exhibieron al menos dos de las características mencionadas previamente. Complementan las Figuras 27 a 31.

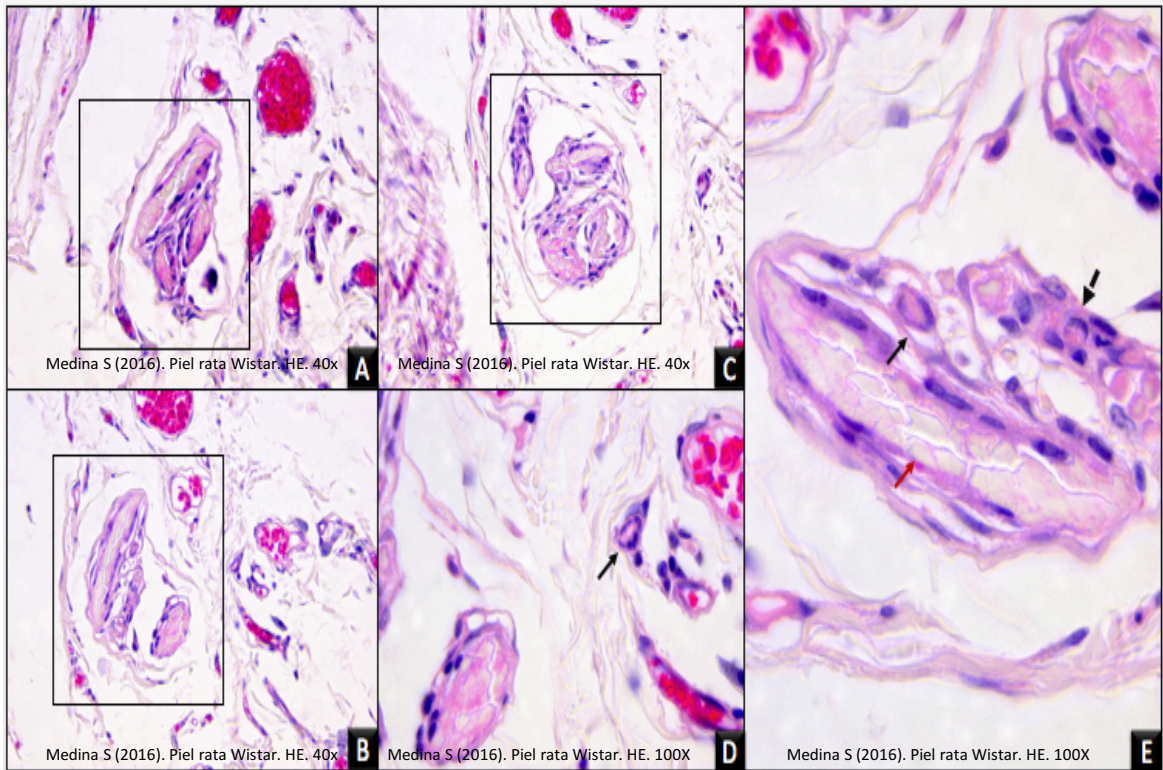


Figura 27. Respuesta granulomatosa muestra 6P4M (I1). Observe a diferentes cortes como hay una organización celular periférica a un material birrefringente(Recuadro negro Imagen A, B, C), aparentemente particulado (Imagen D, Flecha continua roja Imagen E). Se pueden apreciar células multinucleadas con una disposición de núcleos en herradura compatible con Célula Gigante Multinucleada de cuerpo extraño (Flecha negra continua) e igualmente células con morfología tipo epiteliode con núcleo en forma de media luna (flecha discontinua). Objetivo 40X: A, B, C: Objetivo 100X: D, E.

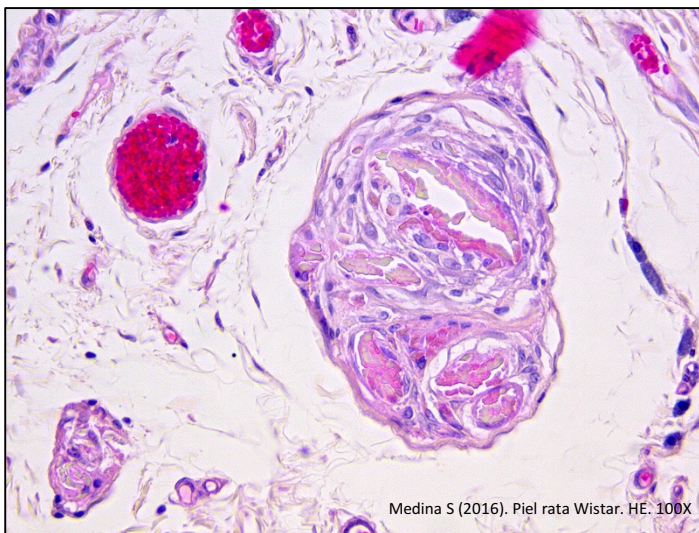


Figura 28. Respuesta granulomatosa muestra 6V4M (I1). Se observa que el material central tiñe altamente acidófilo y su organización difiere de estructuras similares como los folículos pilosos de este biomodelo. Objetivo 100X.

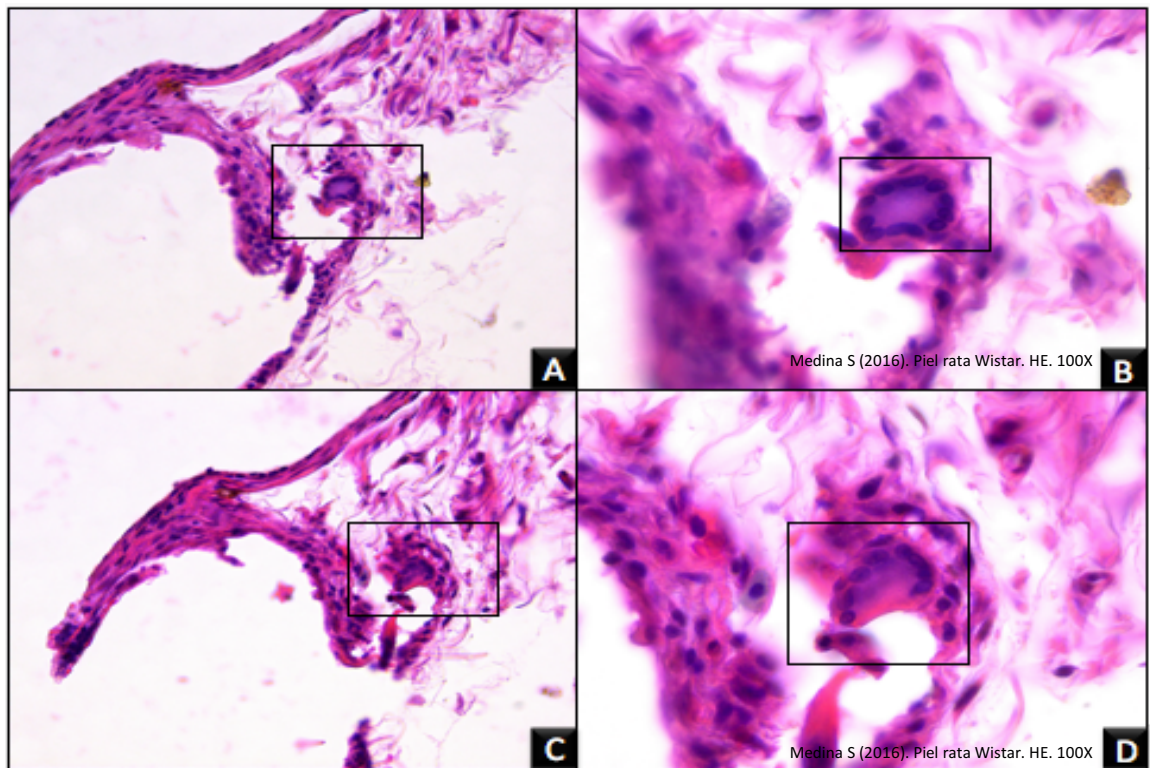


Figura 29. Respuesta granulomatosa muestra 6P4M (I1). Observe la alta celularidad en la banda acidófila que representa a la cápsula fibrosa y en su próxima se observan células con varios núcleos en disposición de herradura compatible con célula gigante multinucleada de cuerpo extraño (recuadro negro). Objetivo 40X: A, C. Objetivo 100X: B, D.

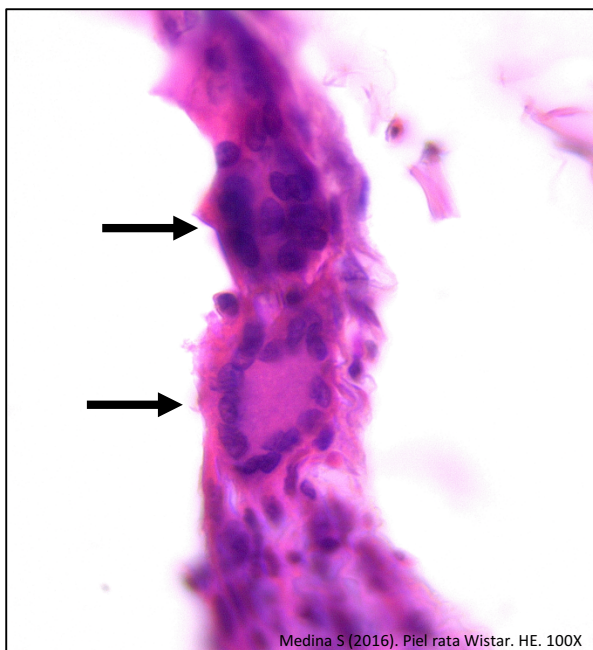


Figura 30. Presencia de células compatibles a células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño dentro de la cápsula fibrosa de la muestra 6P4M (I1). Objetivo 100X. Este patrón asemeja al tipo de célula gigante denominado “de Langhans” que no es típica de RGCE secundaria a biomateriales en humanos.

4.1.5.4. Presencia de material extraño en región peri-capsular y tipo de material observado

Material extraño	Frecuencia	Porcentaje	Acumulado
Gránulos de hemossiderina (GH)	1	2.70	2.70
Material birrefringente (MB)	2	5.42	8.12
Material negruzco granular (MNG)	5	13.51	21.62
GH + MB	1	2.70	24.32
GH + MNG	1	2.70	27.02
MB + MNG	2	5.41	32.43
Ausente	13	35.13	67.56
No aplica	12	32.43	100.00
Total	37	100.00	

Tabla 23. Materiales extraños en región peri-capsular

Por otra parte, en la región peri-capsular fue posible determinar la presencia de materiales o elementos no constitutivos de la cápsula fibrosa que se consideraron “Materiales extraños”, sin confundir este concepto con el de “cuerpo extraño”, dado que no todos los materiales a mencionar a continuación fueron los formadores directos de una RCE. Los tres elementos que se clasificaron como materiales extraños fueron: Gránulos de hemossiderina, que se encontraron aislados en solo una de las muestras pero en conjunto con otro elemento extraño, en dos muestras más. El tipo de material extraño que con más frecuencia se encontró fue el “Material negruzco granular”, un elemento intra-citoplasmático que era muy común en algunas células con características de fagocitos a nivel de la región peri-capsular, sobre todo el tejido conectivo peri-implantar. No se pudo inferir el origen de este material. En un poco más de un tercio de las muestras no se encontró algún material extraño peri-capsular (Figuras 32 y 33).

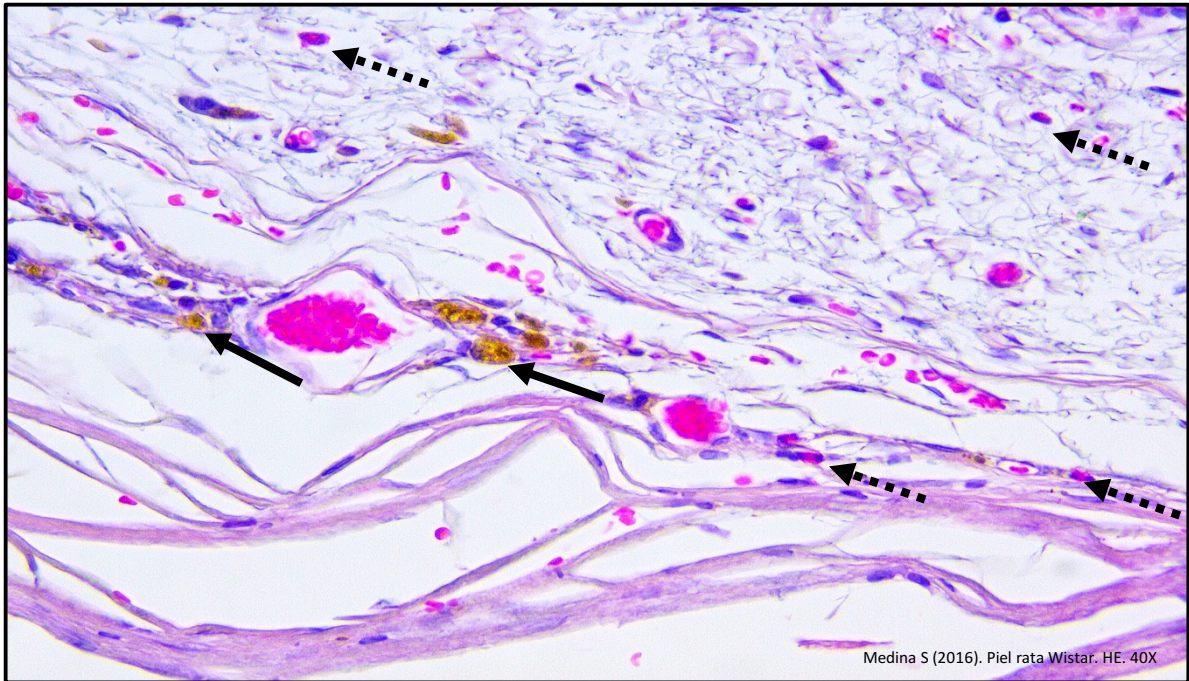


Figura 31. Hallazgos de materiales pericapsulares. Se puede definir la presencia de gránulos de hemosiderina (flecha continua) en la región tisular peri-implantar, incluso se pueden encontrar depósitos intracapsulares. Observe igual la presencia de eosinófilos por dentro y fuera de la cápsula (Flecha discontinua). Objetivo 40X.

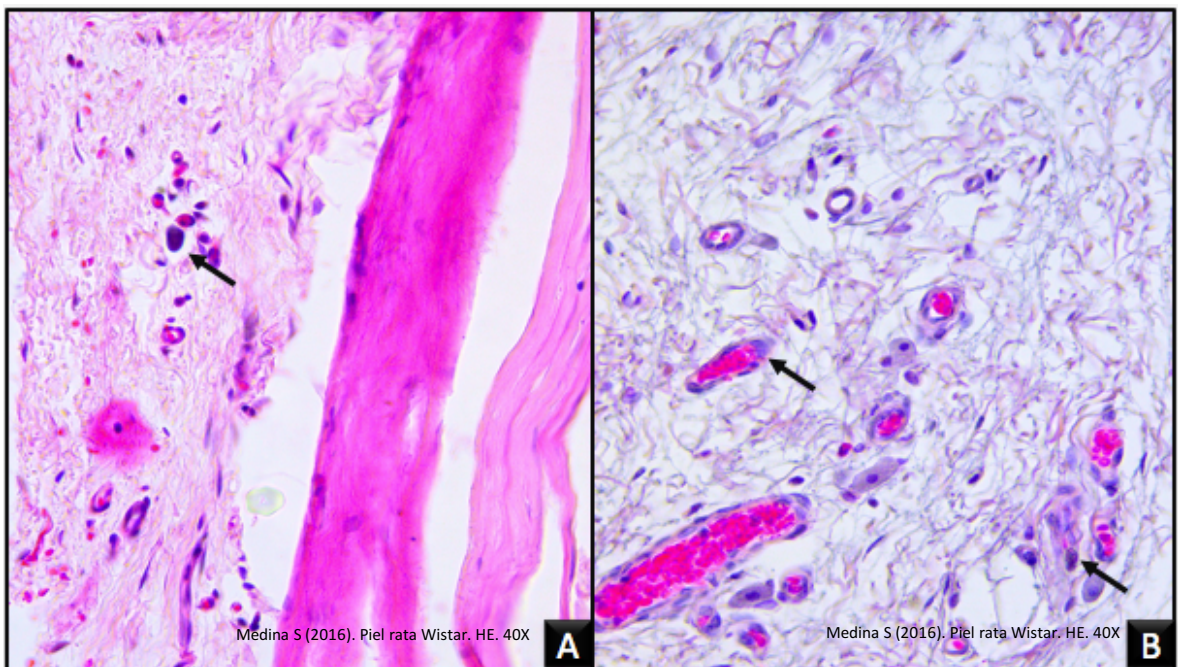


Figura 32. Células compatibles morfológicamente con macrófagos con material negruzco granular citoplasmático. Se pueden observar en el tejido peri-implantar.

4.2. Análisis bivariado para distribución de las variables dependientes de interés en relación a la variable independiente “grupo de experimentación”

Se realizó el test exacto de Fisher, teniendo en cuenta que a un valor $< p=0.05$ sería estadísticamente significativo, teniendo en cuenta las variables: dermis, presencia de cápsula fibrosa, presencia de inflamación peri-capsular y tipo de inflamación.

4.2.1. Cambios en la dermis entre los tres grupos de estudio

Grupo	Dermis		Total	Valor p
	Alterada	Sin alteraciones		
I1	21	0	4	0.0000
	63.64	0.00	10.81	
I2	12	0	12	
	36.36	0.00	32.43	
CH	0	4	21	
	0.00	100.00	56.76	
Total	33	4	37	
	100.00	100.00	100.00	

Tabla 24. Cambios en la dermis entre los grupos de estudio. $p<0.05$. **I1:** Intervención 1; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico

Se observó que los cambios que presentaron las muestras respecto a la dermis son estadísticamente significativas ($p=0.0000$) y hace entender que la presencia de un dispositivo implantado cambia las condiciones de normalidad de la piel, mientras que la ausencia de un dispositivo implantado, a pesar de generarse el mismo trauma durante el proceso de implantación, podría no ser suficiente para generar cambios en el tejido de la dermis, por lo tanto, la presencia crónica de un dispositivo implantado tipo microchip RFID pasivo con o sin recubrimiento polimérico generará cambios en el componente fibrilar o no fibrilar de la matriz extracelular del tejido conectivo dérmico.

4.2.2. Presencia de cápsula fibrosa e inflamación peri-capsular para los tres grupos de estudio

Grupo	Cápsula fibrosa		Total	Valor p	Inflamación peri-capsular		Total	Valor p
	Ausente	Presente			Ausente	Presente		
I1	3	18	21	0.002	3	18	21	0.002
	25.00	0.00	56.76		25.00	72.00	10.81	
I2	5	7	12		5	7	12	
	41.67	28.00	32.43		41.67	28.00	32.43	

CH	4	0	4	4	0	4
	33.33	72.00	10.81	33.33	0.00	10.81
Total	12	25	37	12	25	37
	100.00	100.00	100.0	100.00	100.00	100.00

Tabla 25. Presencia de cápsula fibrosa e inflamación peri-capsular $p<0.05$ **I1:** Intervención 1; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico

Fue coincidente la presencia de una cápsula fibrosa y la presencia de inflamación peri-capsular, es decir, en 100% de los casos de formación de una respuesta fibrótica de este tipo se encuentran signos celulares de inflamación en los tejidos circundantes o dentro de la estructura. De igual forma, se encontró un valor p significativo ($p=0.002$) tanto para la presencia de cápsula e inflamación peri-capsular entre grupos, es decir, que el comportamiento que tuvo cada grupo no es dado al azar, y hay factores condicionantes y particulares para cada grupo, que permiten que la diferencia en la respuesta tisular se pueda dar.

4.2.3. Tipo de infiltrado inflamatorio según densidad celular presente para los tres grupos de estudio

Grupo	Tipo inflamación			Total	Valor p
	CL	CM	NA		
I1	13	5	3	21	0.021
	72.22	71.43	25.00	56.76	
I2	5	2	5	12	
	27.78	28.57	41.67	32.43	
CH	0	0	4	4	
	0.00	0.00	33.33	10.81	
Total	18	7	12	37	
	100.00	100.00	100.00	100.00	

Tabla 26. Tipo de inflamación según densidad celular para los tres grupos de estudio $p<0.05$. **I1:** Intervención 1; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico; **CL:** Crónico Leve; **CM:** Crónico Moderado; **NA:** No aplica.

Con un nivel de confianza del 95%, se pudo determinar que existen diferencias significativas entre el tipo de inflamación que se encuentra en los biomodelos de los tres grupos de estudio, encontrándose una mayor frecuencia de inflamación crónica leve (48.6%) que inflamación crónica moderada. La baja cantidad de biomodelos del grupo control histológico y la ausencia de una inflamación tisular localizada, podría estar influenciando este resultado.

4.3. Análisis bivariado para distribución de las variables dependientes de interés en relación a la variable independiente “tiempo de implantación”

Se realizó el test exacto de Fisher, teniendo en cuenta que a un valor $p < 0.05$ sería estadísticamente significativo, teniendo en cuenta las variables: dermis, presencia de cápsula fibrosa, presencia de inflamación peri-capsular y tipo de inflamación. Ninguno de los resultados expuestos a continuación presentó significancia estadística, por lo cual se puede considerar que la variable tiempo de implantación no es de gran relevancia para la generación de cambios tisulares originados por un cuerpo extraño implantado a nivel subcutáneo.

4.3.1. Cambios en la dermis en función del tiempo de implantación

Grupo	2 meses			Valor p	4 meses			Valor p
	Dermis Alterada	Dermis Normal	Total		Dermis Alterada	Dermis Normal	Total	
I1	6	0	6	0.1	4	0	4	0.125
	66.67	0.00	60.00		57.14	0.00	50.00	
I2	3	0	3		3	0	3	
	33.33	0.00	30.00		42.86	0.00	37.50	
CH	0	1	1		0	1	1	
	0.00	100.00	10.00		0.00	100.00	12.50	
Total	9	1	10		7	1	8	
	100.00	100.00	100.0		100.00	100.00	100.0	

Tabla 27. Cambios en la dermis en función del tiempo de implantación (2 meses y 4 meses) para cada grupo de estudio. $p < 0.05$. **I1:** Intervención 1; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico.

Grupo	6 meses			Valor p	8 meses			Valor p
	Dermis Alterada	Dermis Normal	Total		Dermis Alterada	Dermis Normal	Total	
I1	6	0	6	0.1	5	0	5	0.111
	66.67	0.00	60.00		62.50	0.00	55.56	
I2	3	0	3		3	0	3	
	33.33	0.00	30.00		37.50	0.00	33.33	
CH	0	1	1		0	1	1	
	0.00	100.00	10.00		0.00	100.00	11.11	
Total	9	1	10		8	1	9	
	100.00	100.00	100.0		100.00	100.00	100.0	

Tabla 28. Cambios en la dermis en función del tiempo de implantación (6 meses y 8 meses) para cada grupo de estudio. $p < 0.05$. **I1:** Intervención 1; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico.

4.3.2. Presencia de cápsula fibrosa en función del tiempo de implantación

Grupo	2 meses			Valor <i>p</i>	4 meses			Valor <i>p</i>
	Cápsula fibrosa Ausente	Cápsula fibrosa Presente	Total		Cápsula fibrosa Ausente	Cápsula fibrosa Presente	Total	
I1	1	5	6	0.458	1	3	4	0.486
	33.33	71.43	60.00		25.00	75.00	50.00	
I2	1	2	3		2	1	3	
	33.33	28.57	30.00		50.00	25.00	37.50	
CH	1	0	1	0.458	1	0	1	0.486
	33.33	0.00	10.00		25.00	0.00	12.50	
Total	3	7	10		4	4	8	
	100.00	100.00	100.0		100.00	100.00	100.0	

Tabla 29. Presencia de cápsula fibrosa en función del tiempo de implantación (2 meses y 4 meses) para cada grupo de estudio. $p < 0.05$. **I1:** Intervención 1; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico.

Grupo	6 meses			Valor <i>p</i>	8 meses			Valor <i>p</i>
	Cápsula fibrosa Ausente	Cápsula fibrosa Presente	Total		Cápsula fibrosa Ausente	Cápsula fibrosa Presente	Total	
I1	1	5	6	0.458	0	5	5	0.167
	33.33	71.43	60.00		0.00	71.43	55.56	
I2	1	2	3		1	2	3	
	33.33	28.57	30.00		50.00	28.57	33.33	
CH	1	0	1	0.458	1	0	1	0.167
	33.33	0.00	10.00		50.00	0.00	11.11	
Total	3	7	10		2	7	9	
	100.00	100.00	100.0		100.00	100.00	100.0	

Tabla 30. Presencia de cápsula fibrosa en función del tiempo de implantación (6 meses y 8 meses) para cada grupo de estudio. $p < 0.05$. **I1:** Intervención 1; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico.

4.3.3. Presencia de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación

Grupo	2 meses			Valor p	4 meses			Valor p
	Inflamación pericapsular		Total		Inflamación pericapsular		Total	
	Ausente	Presente			Ausente	Presente		
I1	1	5	6	0.458	1	3	4	0.486
	33.33	71.43	60.00		25.00	75.00	50.00	
I2	1	2	3		2	1	3	
	33.33	28.57	30.00		50.00	25.00	37.50	
CH	1	0	1		1	0	1	
	33.33	0.00	10.00		25.00	0.00	12.50	
Total	3	7	10		4	4	8	
	100.00	100.00	100.0		100.00	100.00	100.0	

Tabla 31. Presencia de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación (2 meses y 4 meses) para cada grupo de estudio. $p < 0.05$. **I1:** Intervención 1; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico.

Grupo	6 meses			Valor p	8 meses			Valor p
	Inflamación pericapsular		Total		Inflamación pericapsular		Total	
	Ausente	Presente			Ausente	Presente		
I1	1	5	6	0.458	0	5	5	0.167
	33.33	71.43	60.00		0.00	71.43	55.56	
I2	1	2	3		1	2	3	
	33.33	28.57	30.00		50.00	28.57	33.33	
CH	1	0	1		1	0	1	
	33.33	0.00	10.00		50.00	0.00	11.11	
Total	3	7	10	2	7	9		
	100.00	100.00	100.0	100.00	100.00	100.0		

Tabla 32. Presencia de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación (6 meses y 8 meses) para cada grupo de estudio. $p < 0.05$. **I1:** Intervención 1; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico.

4.3.4. Tipo de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación

2 meses					4 meses					
Grupo	Tipo de inflamación			Total	Valor p	Tipo de inflamación			Total	Valor p
	CL	CM	NA			CL	CM	NA		
I1	2	3	1	6	0.871	3	0	1	4	0.271
	66.67	75.00	33.33	60.00		100.00	0.00	25.00	50.00	
I2	1	1	1	3		0	1	2	3	
	33.33	25.00	33.33	30.00		0.00	100.00	50.00	37.50	
CH	0	0	1	1		0	0	1	1	
	0.00	0.00	33.33	10.00	0.00	0.00	25.00	12.50		
Total	3	4	3	10	3	1	4	8		
	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		

Tabla 33. Tipo de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación (2 meses y 4 meses) para cada grupo de estudio. $p < 0.05$. **I1:** Intervención 1; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico; **CL:** Crónico Leve; **CM:** Crónico Moderado; **NA:** No aplica.

Grupo	6 meses				Valor p	8 meses				Valor p
	Tipo de inflamación			Total		Tipo de inflamación			Total	
	CL	CM	NA			CL	CM	NA		
I1	4	1	1	6	0.786	4	1	0	5	0.325
	66.67	100.0	33.33	60.00		66.27	100.0	0.00	55.56	
I2	2	0	1	3		2	0	1	3	
	33.33	0.00	33.33	30.00		33.33	0.00	50.00	33.33	
CH	0	0	1	1		0	0	1	1	
	0.00	0.00	33.33	10.00	0.00	0.00	50.00	11.11		
Total	6	1	3	10	6	1	4	9		
	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		

Tabla 34. Tipo de inflamación pericapsular en función del tiempo de implantación (6 meses y 8 meses) para cada grupo de estudio. $p < 0.05$. **I1:** Intervención 1; **I2:** Intervención 2; **CH:** Control Histológico.; **CL:** Crónico Leve; **CM:** Crónico Moderado; **NA:** No aplica.

5. DISCUSIÓN

La implantación de Microchips RFID pasivos puede llevar eventualmente al desencadenamiento de una serie de reacciones celulares y tisulares que conducen a cambios irreversibles en el sitio infiltrado, que en gran parte de los casos, no desencadena un peligro inminente para el organismo receptor de dicho dispositivo implantado. Dichos cambios pueden desencadenar desde una simple reacción inflamatoria de curso agudo que se resuelva en horas o días, hasta la formación de una respuesta mediada por macrófagos y algunas otras células conformando una RGCE secundaria a biomateriales. A continuación, los resultados de este estudio van a ser contrastados a partir de los protocolos de uso del biomodelo y elección del sitio de implantación, y los objetivos específicos planteados inicialmente.

5.1. Biomodelo usado para evaluación de cambios tisulares frente a un dispositivo tipo Microchip RFID pasivo, fijación y lugar de implantación de los dispositivos implantados a nivel subcutáneo

Son diversos los tipos de biomodelos que pueden ser usados para la evaluación de la respuesta tisular a un microchip RFID pasivo o a un material implantable. Linder *et al*, usaron 48 ratones hembra NMRI de tres semanas de edad(68), mientras que Rao y Edmoson estudiaron biopsias de tejido peri-implantar en microchips de implantación subcutánea en 70 ratones B6C3F1(6), y Tillman *et al*, realizaron un estudio en 4279 ratones CBA/J(7). Estos métodos difieren del presente estudio donde se utilizaron 28 ratas Wistar (*Rattus Novergicus*) macho dada la fácil disponibilidad del biomodelo, su mayor longevidad comparado con un ratón su fácil manipulación y manutención y además, teniendo en cuenta la buena receptividad que tienen este tipo de biomodelos a procedimientos semi-quirúrgicos como lo es la implantación de microchips RFID pasivos o capsulas de vidrio. De igual forma, en el presente estudio se ha tenido en cuenta solo la utilización de machos adultos (5 meses de vida) y no una población mixta o exclusiva de hembras, debido a las diferencias que se pueden manifestar por edad y sexo en ratas en cuanto a la cicatrización, algo que reporta Onur *et al* relacionándolo a la presencia de los estrógenos en las hembras, que lleva a una mejor y más rápida cicatrización, comparado con los machos y su carga de andrógenos, en especial testosterona(108); incluso este estudio tuvo en cuenta el envejecimiento y la capacidad de cicatrizar adecuadamente, y los autores mostraron a la edad como un factor que también podía condicionar la cicatrización del biomodelo cuando este ya está envejecido (más de un año), por ejemplo, demostraron que en biopsias de piel se encuentra mayor cantidad de polimorfonucleares y macrófagos a los 7 días posterior a una herida de piel en ratas macho envejecidas, comparado con ratas jóvenes, y que la presencia de linfocitos aumenta y se mantiene al mismo nivel hasta el día 21 mientras que dicha respuesta celular se recude en ratas jóvenes, pero parámetros como la epitelización de la herida, la presencia de fibroblastos y la

expresión de un indicador de angiogénesis como VEGF, es mayor en ratas jóvenes comparado con las ratas envejecidas, lo que puede ser interpretado como una capacidad limitada de cicatrización que se va generando en el envejecimiento producto de una menor capacidad de angiogénesis y respuestas celulares inflamatorias más largas. Todos nuestros biomodelos empezaron el estudio con la misma edad posterior al nacimiento, pero fueron sacrificados en diferentes periodos de tiempo, para describir los hallazgos tisulares y las posibles diferencias entre grupos de implantación. A pesar de esto, no existieron diferencias significativas para ninguno de los biomodelos en las variables de estudio con relación a la variable tiempo. Esto puede ser consecuencia de una fácil resolución en estadios tempranos de implantación (menos de dos meses) y que en el tiempo, los cambios que se hayan producido, sean estables en el tiempo, por lo tanto la generación eventual de una RGCE secundaria a biomateriales se daría principalmente en los días más cercanos al momento de la implantación de un dispositivo como los microchips RFID pasivos recubiertos con Parylene C®. Coincidimos con Linder *et al* dividiendo las muestras (es decir, las biopsias obtenidas de cada biomodelo del grupo Intervención Experimental) entre la mitad recubierta con Parylene C® y la otra con el vidrio inerte para evaluar los cambios que habrían entre superficies(68), a pesar de que no encontramos cambios significativos para este hallazgo entre los individuos del grupo mencionado, lo cual permite dilucidar que la respuesta de encapsulamiento que sufre el microchip RFID pasivo o incluso, la cápsula de vidrio inerte no es exclusivamente dependiente de la existencia del recubrimiento parcial de Parylene C®.

Hay evidencia del uso de otro tipo de biomodelos como el caso del estudio de Gruys *et al* que usaron cerdos(63) o cochinitos en el caso del estudio de Birck MM *et al*(109) o incluso el uso de perros para evaluar el efecto de la implantación de microchips RFID pasivos en el estudio de Jansen *et al*(64), con una metodología de estudio similar entre todos. Otras investigaciones coinciden con el uso de ratas como es el caso del trabajo de Ball *et al* que usaron ratas Sprague-Dawley (*Rattus Norvegicus*)(62) o el estudio de Oviedo-socarras *et al* usaron ratas Wistar machos con un peso de 300-350gr con la diferencia que usaron discos de polieter – poliuretano y no microchips pasivos de identificación(110). Si bien, el uso de las ratas como biomodelos permite facilidades en la observación, manipulación, análisis y obtención de muestras, éstas se alejan mucho de la realidad estructural y funcional en el aspecto histológico con el ser humano, por lo cual, los cerdos o cochinitos ofrecen una realidad más cercana al humano para obtener resultados eventualmente extrapolables.

En cuanto a la región de implantación, hay coincidencia con Tillman *et al* al manejar las implantaciones a nivel dorso-lateral(7) al igual que Oviedo-socarras *et al* con sus discos de polímero(110), aunque es generalizado encontrar en la literatura como método de marcación, la implantación dorsal de este tipo de dispositivos.

Por otra parte, esta investigación difiere ampliamente en la cantidad de biomodelos

usados, comparados con los estudios de Rao y Edmonson (70 ratones) o Tillman (4279 ratones) aunque se debe tener en cuenta que estos autores hallaron de forma casual dichos resultados en biomodelos que hacían parte de otros estudios con objetivos de investigación diferentes a los planteados en los trabajos de investigación, por lo cual, parte de los cambios tisulares iniciales (entre 0 y 2 meses post implantación), no fueron tenidos en cuenta dentro de la evaluación de cada biomodelo(6,7).

La literatura también reporta diferentes momentos de observación para la descripción de los cambios tisulares. Ball *et al* observaron los cambios hasta un año después de la implantación(62), Rao y Edmoson obtuvieron las biopsias de piel a 3, 15 y 24 meses de uso subcutáneo(6) y Birck MM *et al* reportan la implantación en vida intrauterina, dejando los microchips por un máximo de 23 días con implantación intramuscular a nivel del músculo femoral de cualquier lateralidad(109). En el presente estudio se determinaron cuatro grupos para la obtención de las muestras a partir de los dos meses de implantación, extendiéndose hasta los ocho meses, lo que permitió hacer una descripción a corto y mediano plazo, la cual no estaba detallada en la literatura y permitiría observar cambios desde etapas iniciales y de progresión en el tiempo. Hay otro claro contraste con base al manejo de los grupos control e intervención, ya que en el estudio de Jansen *et al*, se usó en un mismo biomodelo (perros) hasta 6 dispositivo implantados (evaluaron 90 microchips RFID pasivos, 45 solo con cápsula de vidrio, 30 solo con cápsula de vidrio grabada con ácido y 15 con cápsula de vidrio recubierta parcialmente con *Parylene C*®)(64) y en Birck MM *et al* el músculo femoral contralateral fue usado como control(109), igual en Linder *et al* usando como controles de piel, una biopsia del mismo animal(68). Para el presente estudio no se utilizó el mismo biomodelo como control con el fin de evitar un sesgo experimental por exposición a un trauma adicional, que podría eventualmente afectar la respuesta ante el dispositivo evaluado (fuera el microchip RFID pasivo o la cápsula de vidrio) o aumentar la respuesta inflamatoria sistémica en el biomodelo que pudiera enmascarar o modificar las condiciones de la región de estudio(10).

Por último, hay que considerar que también existen discrepancias en la manipulación de las muestras para el procesamiento histoquímico, por su parte Tillman *et al* y Linder *et al* coinciden en haber usado formalina buferada al 4%(7,68), mientras que Birck *et al*, Jansen *et al* y Oviedo-socarras *et al* optaron por formalina buferada al 10% sin especificar el tiempo de fijación(64,109,110), excepto en el trabajo de MM Birck, donde explica que la fijación se realizó por 40 horas. En el actual estudio, las muestras fueron fijadas por 108 horas (4.5 días) bajo una temperatura ambiente de laboratorio entre 20°C a 22°C a una relación volumen muestra : volumen agente fijador de 1:10 teniendo en cuenta los resultados y recomendaciones del estudio sobre uso de formalina y formol de Buesa y Peshkov(107), en el cual varios órganos fueron evaluados, entre ellos la piel, siendo este, uno de los órganos más difíciles de procesar y que requiere de mayor cuidado durante el periodo de fijación, deshidratación e inclusión. De hecho en el actual

estudio se presentaron dificultades técnicas durante el procesamiento que hicieron particularmente que en las muestras del grupo “Intervención experimental” se encontrara una escasa cohesión del tejido conectivo dérmico y peri-implantar, que llevaba a estallamiento de la muestra al incluirse a un medio acuoso como el baño de Maria; la evidencia de este hallazgo se puede encontrar en algunas imágenes de las placas histológicas donde se ve la dispersión del componente fibrilar del tejido conectivo en muestras teñidas con Hematoxilina – Eosina y Tricrómica de Masson (Figura 33). Algo similar pasó en el estudio de Linder *et al* en el cual dos especímenes no pudieron ser evaluados por pobre calidad histológica de las muestras.

En cuanto a las coloraciones usadas, Birck MM *et al*, tiñeron las muestras con Hematoxilina – Eosina, Rojo Picrosirio para evaluar fibrosis y usaron el método de Sweets and Gordon para evaluar la formación de fibras reticulares(109), mientras que Jansen *et al* optaron por usar azul de metileno y fucsina básica(64). En el presente estudio se consideró el uso de las tinciones Hematoxilina – Eosina y Tricrómica de Masson por la facilidad que brinda para evaluar celularidad, características fibrilares de los tejidos y discriminación de estructuras.

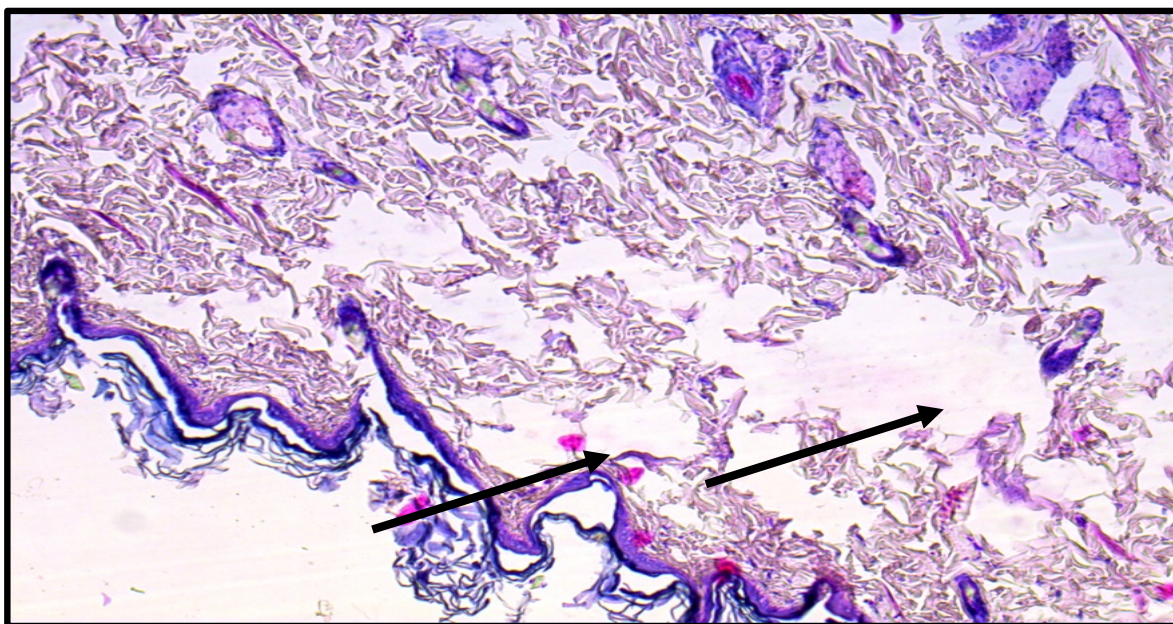


Figura 33. Muestra de piel correspondiente al grupo Intervención experimental. Observe que por debajo de la epidermis, el tejido conectivo de la dermis reticular pierde la cohesión regular observable en estas muestras (flechas).

Características de los microchips y el Parylene C®

Park *et al*(27), estudiaron la función del *Biobond*® en microchips RFID pasivos (*Destron*® TXI400L) implantados de forma subcutánea en la región interescapular de perros Beagles de un instituto de investigaciones. Luego de dos años de seguimiento, se evaluó el funcionamiento del microchip (lectura del escáner) y posterior a biopsia escisional del implante y el tejido conectivo peri-implantar, concluyeron sobre la formación de una cápsula de tejido fibroso alrededor del microchip, la cual impidió la migración del mismo.

Kaminska *et al*(2), examinaron las interacciones del *Parylene C*® con sujetos biológicos como proteínas del plasma sanguíneo, plaquetas, células endoteliales y células de *E. Coli*, concluyendo que si bien el biopolímero no afecta la proliferación ni la viabilidad de las células, si modifica la expresión génica de las mismas, constituyéndose en un riesgo potencial para una tumorigénesis. No obstante, Lee *et al*(3), estudiaron la biocompatibilidad del *Parylene C*® al implantarlo en la mucosa de la vejiga urinaria de ratas, encontrando que la reacción inflamatoria fue limitada a la cara exterior de la vejiga y no se expandía hacia la capa muscular, lo que les permitió concluir que el biopolímero puede ser un excelente biomaterial para un dispositivo implantable en la vejiga urinaria. Wei *et al*(4), estudiaron la biocompatibilidad a largo plazo y la integración al tejido de dispositivos implantados recubiertos con *Parylene C*®, a partir de una respuesta de cuerpo extraño en la que el tejido circundante produce un encapsulamiento fibroso y denso, pero no la integración con el tejido. Los autores encontraron que la adhesión celular fue significativamente mejor en sustratos fibrosos recubiertos con *Parylene C*® respecto a los no recubiertos, concluyendo que el polímero estimula la proliferación celular y facilita la unión e interacción de los fibroblastos.

Finalmente, Nguyen(5) estudió el depósito de películas de *Parylene C*® sobre sustratos tipo HARMS usados para aplicaciones biomédicas en cultivos celulares, concluyendo que *Parylene C*® no es citotóxico y que resulta idóneo para recubrir cualquier dispositivo médico implantable.

5.2. Formación de una RGCE secundaria a biomateriales

La RGCE secundaria a biomateriales resulta siendo una reacción generalizada de un huésped a la presencia de una sustancia o elemento inerte la cual no es ni un solo evento ni un proceso simple, es un fenómeno multifactorial (The Williams Dictionary of Biomaterials). Diversos estudios ponen en manifiesto diferencias entre los hallazgos de la presencia o no de este tipo de eventos. Por su parte, Gruys *et al* emplearon pruebas de citotoxicidad en cultivos de fibroblastos humanos y test de hemólisis en sangre humana, lo cual demostró biocompatibilidad del vidrio inerte, los hallazgos de los autores indican que no hubo reacción de tipo cuerpo extraño(63). Sin embargo, Linder *et al*, compararon histológicamente el tejido peri-implantar subcutáneo de ratas macho a quienes se les implantaron microchips RFID pasivos solo con su cápsula de vidrio y recubiertos parcialmente con *Parylene C*®,

titania y óxido de aluminio en el cual concluyeron que alrededor de los microchips aumentan los niveles de celularidad y que particularmente, en los microchips recubiertos con *Parylene C*® se podía describir una reacción a cuerpo extraño(68). A pesar de que se pueda dar una eventual RGCE, Gruda *et al*, estudiaron 175 ratones a los cuales les implantaron microchips RFID pasivos con el objetivo de determinar el grado de biocompatibilidad, de tal forma que los autores manifestaron que existe un nivel bajo de reacción a cuerpo extraño y baja frecuencia de toxicidad y carcinogenicidad, llamando la atención al diseño experimental a corto plazo(69). En el presente estudio, se pudo encontrar el desarrollo de una RGCE secundaria a biomateriales en cuatro muestras correspondientes al grupo intervención experimental (o expuestos al microchip RFID pasivo), pero dichos hallazgos no fueron significativos, por lo cual se puede deducir que los dispositivos de implantación subcutánea tipo microchip RFID pasivo no generan cambios suficientes para desarrollar en todos los casos una RGCE secundaria a biomateriales y que la generación de la misma puede ser debida a factores que obedecen a las diferencias biológicas individuales de cada individuo expuesto. La aparición de las mencionadas RGCE secundarias a biomateriales coincidió con la presencia peri-capsular de materiales extraños como cuerpos birrefringentes que podrían ser eventualmente partes del Parylene C que algunas de las células fagocíticas hayan internalizado, aunque podría coincidir también con restos de unidades folículo-pilosas que desarrollaran respuestas granulomatosas a pelos. Esto fue reportado por Linder *et al*(68), quienes reportaron que granulomas de pelo fueron encontrados en algunos especímenes alrededor de la región implantada o distal a esta y esto podría estar relacionado con el procedimiento de implantación (Figura 34). Es muy difícil determinar el origen del cuerpo birrefringente que se pueda encontrar en estas condiciones, pero dependiendo de la proximidad o lejanía que conserve un conglomerado celular con aspecto granulomatoso con relación a la cápsula fibrosa, se podría diferenciar entre ambos tipos de RGCE secundaria a biomateriales.

En el estudio de Birck MM *et al* describieron que el sitio de implantación estuvo caracterizado por una inflamación granulomatosa con un moderado número de eosinófilos. Se encontraron células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño con núcleos organizados al azar. El grado de deposición de colágeno alrededor del microchip varió desde leve a moderado y constituido principalmente en colágeno maduro, con algunas fibras reticulares presentes, encontrando en dos secciones parte de un material homogéneo dentro del sitio de implantación y finalmente sin observar lesiones macro o microscópicas en la región control(109).

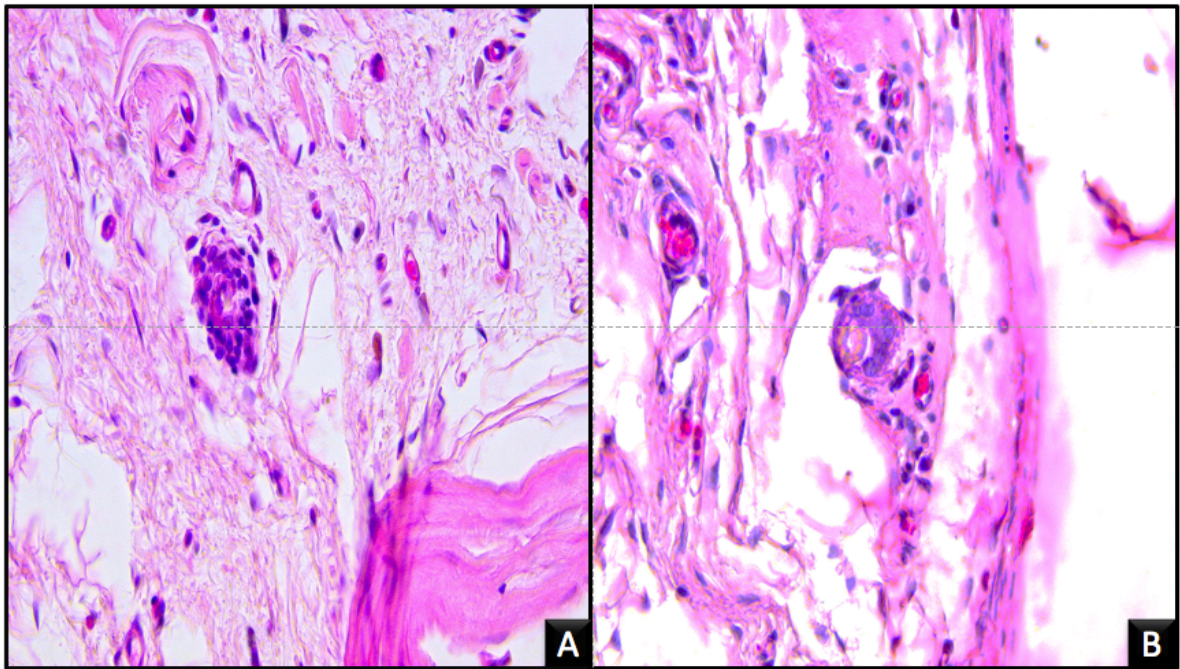


Figura 34. Comparación entre una probable respuesta granulomatosa asociada a pelo (Imagen A) por la similitud morfológica con las células constitutivas de un folículo piloso y lo descrito en este trabajo como una posible RGCE secundaria a biomateriales (Imagen B). Objetivo: 40X en A y B.

5.3. Formación de una cápsula fibrosa como respuesta a la presencia de un elemento implantado y generación de un estadio inflamatorio crónico

El encapsulamiento por medio de un tejido conectivo altamente fibrilar de un cuerpo extraño, sea este de tipo microbiano o de un material de cualquier naturaleza, es una respuesta casi estereotipada en los mamíferos, y terminan siendo el último paso en la resolución de la respuesta celular y tisular frente a un elemento externo al organismo. En la literatura, entre ellos Kastellorizios *et al* describen dos principales fases en la respuesta tisular a un cuerpo extraño: fase aguda (infiltración de células inflamatorias, principalmente neutrófilos) y fase crónica (presencia de fibroblastos activos) la cual concluye con una fase de fibrosis. En el caso de los dispositivos implantados por vía subcutánea, su tamaño, forma, propiedades mecánicas, tipo de biomaterial, la duración de la implantación e incluso método de implantación puede dar una respuesta diferente(111). Teniendo en cuenta este principio, en el presente estudio se pudo observar que todos los sujetos implantados, independientemente de la naturaleza del material de revestimiento o de constitución (Vidrio o Parylene C®) pudieron generar una respuesta tisular que finalizó con un encapsulamiento del material implantado, junto con un aumento local de la vascularización por la presencia de capilares intracapsulares y pericapsulares.

Se puede encontrar un consenso en la aparición de dicha capsula fibrosa. Por su

parte, Rao y Edmoson concluyeron que en la evaluación microscópica se observó una delgada cápsula constituida por fibroblastos y fibras de colágeno maduro, con mínimos signos de inflamación, tejido granulomatoso y ausencia total de cambios neoplásicos(6) e igual que Linder *et al* en los especímenes correspondientes a los implantados con un dispositivo revestido de polímero, se pudo observar un leve infiltrado inflamatorio granulomatoso y alrededor de la cápsula fibrosa(68). En el presente estudio, fue posible determinar la presencia de cápsulas fibrosas en 67% (n=25) de las muestras del estudio, dentro de las cuales 75% (n=11) de ellas correspondían al grupo implantado con un microchip RFID pasivo, es decir, en la mayoría de los casos se encontró la formación de dicha cápsula en presencia del microchip revestido con Parylene C®, aunque esto no representó una diferencia significativa con los otros grupos observados. Un aspecto a tener en cuenta, es que dentro del mismo grupo de implantados que presentaron la formación de la cápsula, se encontraron cuatro muestras que mostraron evidencia de la formación de una RGCE secundaria a biomateriales, es decir, se hallaron signos patológicos de células características de una respuesta granulomatosa la cuál era evidentemente focal y con presencia escasa de células gigantes multinucleadas. A su vez, se pudo observar infiltrado linfo-plasmocitarios alrededor de la cápsula fibrosa en lo que se denominó tejido peri-implantar, que a diferencia de los estudios pasados, se comparó estadísticamente entre los grupos los hallazgos y se encontraron diferencias significativas en cuanto a la presencia o no de dicho infiltrado comparándolo entre los tres grupos de estudio ($p=0.0002$) e igualmente comparando el tipo de infiltrado inflamatorio según una escala de leve, moderado o severo entre los grupos de estudio ($p=0.021$). No hay certeza del momento exacto en el que en este estudio se formó la cápsula fibrosa, algunos autores como Ball *et al*, encontraron la formación de la cápsula cápsula fibrosa de tejido conectivo maduro desde las 12 semanas(62) o incluso, Kastellorizios *et al* indicaron que dicho encapsulamiento fibroso (definido como la fase crónica) era claramente visible desde el día 14 en adelante (observada como una banda de luz eosinófila con fibras colágenas orientadas alrededor del implante), aunque, anotan, que la deposición de colágeno alrededor del implante se podía ver en día 7 antes de la encapsulación fibrosa(111). No fue posible comprobar esto en este estudio por los periodos de tiempo escogidos para observación, pero fue claro que para los dos meses post-implantación, una cápsula fibrosa ya podía haberse constituido.

Este encapsulamiento es importante desde el punto de vista inmunológico del huésped, porque representa la capacidad del organismo para adaptarse, pero lo es también para la eficacia del dispositivo y evitar efectos secundarios como por ejemplo, la migración del dispositivo implantado, como lo reporta Jansen *et al*, encontrando luego de 16 semanas de implantación que el 50% de los microchips migraron desde su sitio de implantación (sin importar el Parylene C®), y que al final todos los microchips fueron rodeados por una cápsula de tejido fibroso en la cual no observaron una reacción inflamatoria grave(64). Contrario a dicho hallazgo, en este estudio, no hay reportadas migraciones de los microchips RFID pasivos o de

las cápsulas de vidrio y todos pudieron ser identificados en el sitio inicial de implantación y ubicación, posiblemente por influencia de las estructuras anatómicas de la región interescapular que podían servir como obstáculo biológico si el dispositivo empezaba a migrar sobre su superficie.

En cuanto a los hallazgos reportados sobre el tipo de inflamación o células inflamatorias en las regiones de implantación y en el tejido peri-implantar Ball *et al* señala que se encontraban ocasionales células inflamatorias subagudas presentes en el tejido subcutáneo luego de dos semanas después de la implantación(62), pero MM Birck *et al* no encontraron células inflamatorias alrededor del músculo donde se dio la implantación, aunque reportaron la presencia de algunos eosinófilos alrededor de la región peri-implantar confirmando por medio de la tinción Luna(109). En el actual estudio fue posible encontrar células como polimorfonucleares (PMN), que son características de respuestas inflamatorias agudas, en especial neutrófilos y eosinófilos dispersos de forma difusa en el tejido, específicamente en cuatro muestras correspondientes al grupo intervención experimental (4P8m, 5P2m, 9P2m, 9V2m) pero no hacen parte de los que manifestaron una RGCE secundaria a biomateriales o gigantocelular. A pesar de que los PMN se constituyan como células de respuestas inflamatorias agudas, se ha descrito que es normal la aparición en reacciones granulomatosas de este tipo, cuando hay una exposición a biomateriales de diversa naturaleza en su fase aguda, e incluso persistentes en el tiempo resultado de la quimiotaxis generada y retroalimentada por las células locales en la respuesta y mantenida por las quimioquinas CXCL-1, CXCL-2, CXCL-8, CCL-3 y CCL-5 principalmente (75,112).

Un aspecto adicional a tener en cuenta fue el grosor de la cápsula fibrosa dado que Gruys *et al* reportaron la formación una estructura tipo cápsula de 0,2 mm de grosor alrededor del implante asociados a los procesos cicatrizales (63) y Oviedo-Socarras 2015 *et al* reporta grosores de cápsulas fibrosas diferentes entre sus grupos de biomodelos, es decir, espesores de $294.5 \pm 18.5 \mu\text{m}$ para ratas no diabéticas y $169.4 \pm 10.8 \mu\text{m}$ para ratas diabéticas, lo que no difiere mucho del promedio general encontrado en este estudio que fue de $170,8 \mu\text{m} \pm 46.83 \mu\text{m}$ y que entre los grupos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Es importante tener en cuenta que hay un vacío en la literatura al mencionar que corresponde realmente a la cápsula fibrosa, dado que a esta la cubre un tejido conectivo de características menos fibrilares pero aparentemente más denso que la dermis reticular y la periferia del tejido celular subcutáneo y este, podría confundir al observador en el análisis macroscópico o microscópico al momento de determinar la extensión tisular de la cápsula fibrosa.

La formación de la cápsula fibrosa y la estabilidad de esta por periodos de tiempo de mediano a largo plazo, permiten reconocer que la implantación subcutánea de microchips RFID pasivos es plausible desde el punto de vista biológico para las ratas Wistar en particular como sistema de identificación y es necesario determinar

si estos hallazgos podrían ser extrapolados al ser humano.

5.4. Generación de cambios neoplásicos

Por el estímulo crónico y la irritación tisular y celular generada, existe la posibilidad de que un dispositivo de implantación subcutánea como un Microchip RFID pasivo, pueda conducir a la displasia o metaplasia local, suficiente para la generación de tumores benignos o malignos asociados a dicho cuerpo extraño. Si bien no fue objetivo directo de este estudio, es necesario conocer y explorar las teorías respecto a la generación de neoplasias a partir de un dispositivo como el microchip RFID pasivo.

En su estudio, Tillman *et al*(7), encontraron que en 36 especímenes (0,8% de la población total) usados, aparecieron lesiones tumorales como fibrosarcomas e histiocistoma fibroso maligno asociadas al tejido conectivo peri-implantar y además, las hembras fueron afectadas (27/2270) en mayor proporción que los machos (9/2009) con diferencias significativas a un valor $p < 0.01$ usando el test exacto de Fisher. De la misma forma, Elcock *et al*(66), estudiaron la toxicidad crónica y la oncogenicidad en el tejido peri-implantar en ratas F344 a las que se les implantó un microchip RFID pasivo, encontrando una tasa baja (1%) de recurrencia de tumores de origen mesenquimal (schwannoma maligno, fibrosarcoma, sarcoma anaplásico y sarcoma histiocítico) con metástasis ocasional; Blanchard *et al*(65), diseñaron un biomodelo de utilidad a partir de ratones transgénicos (*knock-out* de gen para p53) para estudios a corto plazo sobre cancerogénicidad, en los que estudiaron 177 especímenes a los que se les implantaron microchips RFID pasivos (solo con cápsula de vidrio y con recubrimiento parcial polimérico) y determinaron formación de lesiones tumorales, denominadas por los autores como displasia mesenquimal que pueden conllevar a un sarcoma a nivel del tejido peri-implantar. Por su parte, Le Calvez *et al*(67), reportaron en tres estudios de cancerogénicidad usando ratas con microchips RFID implantados de forma subcutánea, 52 lesiones tumorales de origen mesodérmico (excepto dos asociadas a la glándula mamaria) en el tejido peri-implantar. Este precedente deja manifiesto que la posibilidad de generación de una neoplasia asociada a un dispositivo de implantación subcutánea es muy poco frecuente, como se pudo evidenciar en el presente estudio, donde no se hallaron signos morfológicos tisulares o celulares que dieran sospechas del desarrollo de una lesión tumoral asociada a los microchips RFID pasivos o a las cápsulas de vidrio en alguno de los especímenes, como también lo señalan Rao y Edmoson, reportando ausencia total de cambios neoplásicos en la evaluación de biopsias de piel implantadas(6) al igual que MM Birck *et al*(109).

6. CONCLUSIONES

- Se acepta la hipótesis nula de que no se pueden observar cambios histológicos que constituyan un factor de riesgo la generación de respuestas granulomatosas de tipo cuerpo extraño secundarias a un biomaterial, sea este el vidrio o el Parylene C ® como polímero de revestimiento, debido a que los hallazgos que se encontraron no tuvieron una significancia estadística.
- La rata Wistar no se constituye en un buen modelo para describir y evaluar cambios cutáneos que puedan ser extrapolables al ser humano, pero si lo es para hacer comparaciones entre su grupo y las diversas cepas de *Rattus norvegicus* que existen actualmente, dado que se observan resultados similares en este estudio con los reportados en la literatura utilizando ratones y ratas, y en especial ratas del mismo grupo taxonómico, esta información es útil para los laboratorios que usan o contemplan el uso de los Microchips RFID pasivos como método de identificación.
- La rata Wistar muestra una adecuada adaptación a materiales o dispositivos de implantación subcutánea lo que le permite tener una respuesta macroscópica y microscópica adecuada en cuanto a la latencia de dicho cuerpo extraño, dado que en la mayoría de los casos, logra generar una respuesta fibrótica que lleva al encapsulamiento del dispositivo, sin importar el tipo de revestimiento o composición inicial que dicho cuerpo extraño tenga. Esto está relacionado al hecho de una escasa formación de respuestas granulomatosas de tipo cuerpo extraño secundario a biomateriales visto en el presente estudio, si bien se pueden producir, es limitada su frecuencia.
- A pesar de darse un encapsulamiento fibrótico, los microchips RFID pasivos funcionan correctamente sin importar su latencia en el sitio implantado. Teniendo en cuenta esto y el anterior punto, desde el punto de vista biológico y administrativo, es plausible el uso de Microchips RFID pasivos como método seguro de identificación. Eventualmente, esta plausibilidad podría ser extrapolable a otros individuos como a los seres humanos.
- En este estudio se demostró que las características de los tejidos peri-implantares, es decir, la cápsula fibrótica, el tejido conectivo peri-implantar, las células infiltrantes peri e intra capsulares y la presencia de materiales extraños extra capsulares, no tienen diferencias según el tiempo de permanencia del dispositivo implantado, ya sea este con un recubrimiento parcial de Parylene C® o en vidrio inerte denudado, se constituye de vital importancia son los cambios que ocurran en la fase aguda post-implantación.

7. RECOMENDACIONES

- Al continuar la línea de investigación, se recomienda describir y evaluar la respuesta tisular en plazos de tiempo más cortos, como el primer mes de implantación y organizar grupos de observación y análisis macroscópico y microscópico distribuidos en las cuatro semanas iniciales posterior al procedimiento, que permitan una aproximación más cercana de todo el proceso de generación de la cápsula fibrosa o una eventual RGCE secundaria a biomateriales.
- Se sugiere utilizar otras técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas que permitan la identificación de otros parámetros que no se tuvieron en cuenta en este trabajo como la formación de otras familias colágenas, la expresión de factores de angiogénesis vascular, entre otras.
- Por la inminente inmersión futura de esta tecnología a la vida cotidiana de todos los seres humanos, se recomienda en lo posible, contar con voluntarios humanos para hacer un estudio similar donde se puedan describir los cambios del tejido conectivo dérmico y estructuras anatómicas anexas en la presencia de un cuerpo extraño tipo microchip RFID pasivo recubierto parcialmente con Parylene C®.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. López C, Manchola J, Medina S, Moreno S. Reacción granulomatosa de tipo cuerpo extraño secundaria a biomateriales y su respuesta inmunológica: Revisión sistemática de la literatura. *Salut Sci Spiritus* 2016;2(1):21–8.
2. Kaminska M, Okroj W, Szymanski W, Jakubowski W, Komorowski P, Nosal A, et al. Interaction of parylene C with biological objects. *Acta Bioeng Biomech* 2009;11(3):19–25.
3. Lee D, Kim S, DW S, Choi B, Lee M, Lee S, et al. Biocompatibility of Parylene-C as a Coating Material of Implantable Bladder Volume Sensor. *Korean J Androl.* 2010;28(3):175–83.
4. Wei L, Lakhtakia A, Roopnariane AP, Ritty TM. Human fibroblast attachment on fibrous parylene-C thin-film substrates. *Mater Sci Eng C.* 2010;30(8):1252–9.
5. Nguyen Q. Characterization of Biocompatible Parylene-C Coatings for BIOMEMS Applications. Louisiana State University; 2011.
6. Rao GN, Edmondson J. Tissue Reaction to an Implantable Identification Device in Mice. *Toxicol Pathol* 1990;18(3):412–6.
7. Tillmann T, Kamino K, Dasenbrock C, Ernst H, Kohler M, Morawietz G, et al. Subcutaneous soft tissue tumours at the site of implanted microchips in mice. *Exp Toxicol Pathol* 1997;49(3–4):197–200.
8. Anderson J. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res.* 2001;31(1):81–110.
9. Albrecht K. Microchip-induced tumors in laboratory rodents and dogs: A review of the literature 1990-2006. In: *International Symposium on Technology and Society, Proceedings.* 2010. p. 337–49.
10. Anderson J, Rodríguez A, Chang D. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):86–100.
11. Gantt G. Department of Health and Human Services, Class II Special Controls Guidance Document: Implantable Radiofrequency Transponder System for Patient Identification and Health Information. *Guid Ind FDA Staff.* 2004;69(237):71702–4.
12. Gantt G. Department of Health and Human Services, Implantable Radiofrequency Transponder System for Patient Identification and Health Information. *Guid Ind FDA Staff.* 2004;69(237):71702–4.
13. Richmond R, Pretty I. The use of radio-frequency identification tags for labeling dentures-scanning properties. *J Forensic Sci.* 2009;54(3):664–8.
14. Meyer H, Chansue N, Monticelli F. Implantation of radio frequency identification device (RFID) microchip in disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int.* 2006;157(2–3):168–71.
15. Thevissen P, Poelman G, De Cooman M, Puers R, Willems G. Implantation of

- an RFID-tag into human molars to reduce hard forensic identification labor. Part I: Working principle. *Forensic Sci Int.* 2006;159(Suppl 1):S33–9.
16. Thevissen P, Poelman G, De Cooman M, Puers R, Willems G. Implantation of an RFID-tag into human molars to reduce hard forensic identification labor. Part 2: Physical properties. *Forensic Sci Int.* 2006;159(Suppl 1):S40–6.
 17. Landt J, Catlin B. *Shrouds of Time: the history of RFID.* First. Pittsburg: The Association of the Automatic Identification and Data Capture Industry; 2011. 1-11 p.
 18. Roberts C. Radio frequency identification (RFID). *Comput Secur.* 2006;25(1):18–26.
 19. Hobo J. The necessity for identification and registration of bovine animals from birth to consumer. *Performance Recording of Animals: State of the Art.* EAAP Publ. 1998;91:53–8.
 20. Jansen M, Eradus W. Future developments on devices for animal radiofrequency identification. *Comput Electron Agric.* 1999;24(1–2):109–17.
 21. Wong K, Hui P, Chan A. Cryptography and authentication on RFID passive tags for apparel products. *Comput Ind.* 2006;57(4):342–9.
 22. Perrin R, Simpson N. RFID and bar codes - critical importance in enhancing safe patient care. *J Healthc Inf Manag.* 2014;18(4):33–9.
 23. Wismans W. Identification and registration of animals in the European Union. *Comput Electron Agric.* 1999;24(1–2):99–108.
 24. Knospe H, Pohl H. RDIF Security. *Inf Secur Tech Rep.* 2004;9(4):39–50.
 25. Master A, Michael K. Lend me your arms: The use and implications of humancentric RFID. *Electron Commer Res Appl.* 2006;6(1):29–39.
 26. Dobson T, Todd E. Radio frequency identification technology. *Comput Law Secur Rep.* 2006;22:313–5.
 27. Park D, Wieser J, Martha E, Dvm AA, Chan V, Ph D. Summary of Field Studies Evaluating the Efficacy of Bio- Bond ® A Porous Polymer Sheath , on Radio Frequency Identification (RFID) Transponders to Prevent Migration from a Known Implant Site). 1997.
 28. Kampers F, Rossing W, Eradus W. The ISO standard for radiofrequency identification of animals. *Comput Electron Agric.* 1999;24(1–2):27–43.
 29. ISO/IEC. ISO 11784 Radio frequency identification of animals - code structure. 1996.
 30. ISO/IEC. ISO 3166 Codes for the Representation of Names of Countries. 1993.
 31. ISO/IEC. ISO 11785 Radio Frequency Identification of Animals -- Technical Concept. 1996.
 32. ISO/IEC. ISO 14223-1 Radiofrequency identification of animals -- Advanced transponders -- Part 1: Air interface. 2001.
 33. Almaraz C. Director of Technology Solutions - IT 2007 [Internet]. VeriChip Corporation. 2006 [cited 2016 Jan 1]. Available from: <http://www.verichipcorp.com> o en www.verimedinfo.com
 34. Halamka J, Juels A, Stubblefield A, Westhues J. The Security Implications of VeriChip Cloning. *J Am Med Informatics Assoc.* 2006;13(6):601–7.

35. Radio-frequency identification: its potential in healthcare. *Health Devices*. 2005;34(5):149–60.
36. Smith A. Evolution and acceptability of medical applications of RFID implants among early users of technology. *Health Mark Q*. 2007;24(1–2):121–55.
37. Öztayşi B, Baysan S, Akpinar F. Radio frequency identification (RFID) in hospitality. *Technovation*. 2009;29(9):618–24.
38. Mehrjerdi Y. Radio frequency identification: the big role player in health care management. *J Heal Organ Manag*. 2011;25(5):490–505.
39. Yao W, Chu C, Li Z. The adoption and implementation of RFID technologies in healthcare: a literature review. *J Med Syst*. 2012;36(6):3507–25.
40. Wamba S. RFID-Enabled Healthcare Applications, Issues and Benefits: An Archival Analysis (1997-2011). *J Med Syst*. 2012;36(6):3393–8.
41. Harvey W. Identity by teeth and the marking of dentures. *Br Dent J*. 1966;121(7):334–40.
42. Turner C, Fletcher A, Ritchie G. Denture marking and human identification. *Br Dent J*. 1976;141(4):114–7.
43. Ryan L, Keller J, Rogers D, Schaeffer L. Clear acrylic resin T-bar used in denture identification. *J Prosthet Dent*. 1993;70(2):189–90.
44. Berry F, Logan G, Plata R, Riegel R. A postfabrication technique for identification of prosthetic devices. *J Prosthet Dent*. 1995;73(4):341–3.
45. Coss P, Wolfaardt J. Denture identification system. *J Prosthet Dent*. 1995;74(5):551–2.
46. Ling B. Computer-printer denture microlabeling system. *J Prosthet Dent*. 1998;79(3):363–4.
47. Borrmann H, DiZinno J, Wasen J, Rene N. On denture marking. *J Forensic Odontostomatol*. 1999;17(1):20–6.
48. Reeson M. A simple and inexpensive inclusion technique for denture identification. *J Prosthet Dent*. 2001;86(4):441–2.
49. Moya V, Roldan B, Sánchez J. *Materiales dentales en la identificación*. Primera. Barcelona: Editorial Masson SA; 1994. 269-276 p.
50. Gladfelter IA, Smith BE. An evaluation of microdisks for dental identification. *J Prosthet Dent* 1989;62(3):352–5.
51. Hansen R. Intraoral micro-identification discs. *J Forensic Odontostomatol*. 1991;9(2):77–91.
52. Milward P, Shepherd P, Brickley M. Automatic identification of dental appliances. *Br Dent J*. 1997;182(5):171–4.
53. Rajan M, Julian R. A new method of marking dentures using microchips. *J Forensic Odontostomatol*. 2002;20(1):1–5.
54. Dentalax Corporation [Internet]. 2007 [cited 2016 Jan 1]. Available from: <http://www.dentalax.com>
55. Moreno F, Vallejo D, Garzón D, Moreno S. In Vitro evaluation of a passive RFID microchip implanted in human molars subjected to compression forces, for forensic purposes of human identification. *J Forensic Dent Sci*. 2013;5(2):77–84.
56. Moreno F, Aragón N, Salazar L. In vitro behavior of interfaces in human molars

- with an implanted passive RFID microchip and subjected to compression forces. *DYNA*. 2013;80(178):5–10.
57. Young B, O'Dowd G, Woodford P. *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*. 6th Editio. Young B, editor. Churchill Livingstone, Elsevier; 2013. 464 p.
 58. Ross M, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology*. 6th editio. LWW; 2010. 974 p.
 59. Kierszenbaum A, Tres L. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 4th Editio. Saunders Elsevier; 2015. 752 p.
 60. Dorsett-Martin W. Rat models of skin wound healing: A review. *Wound Rep Reg*. 2004;12(1):591–9.
 61. Treuting P, Dintzis S. Skin and Anexa. In: Treuting P, Dintzis S, Frevert C, Montine K, editors. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. First. Elsevier; 2011. p. 433–55.
 62. Ball DJ, Argentieri G, Krause R, Lipinski M, Robison RL, Stoll RE, et al. Evaluation of a microchip implant system used for animal identification in rats. *Lab Anim Sci*. 1991;41(2):185–6.
 63. Gruys E, Schakenraad JM, Kruit LK, Bolscher JM. Biocompatibility of glass-encapsulated electronic chips (transponders) used for the identification of pigs. *Vet Rec* 1993;133(16):385–8.
 64. Jansen J, van der Waerden J, Gwalter R, van Rooy S. Biological and migrational characteristics of transponders implanted into beagle dogs. *Vet Rec*. 1999;145(12):329–33.
 65. Blanchard KT, Barthel C, French JE, Holden HE, Moretz R, Pack FD, et al. Transponder-Induced Sarcoma in the Heterozygous p53+/- Mouse. *Toxicol Pathol* 1999;27(5):519–27.
 66. Elcock LE, Stuart BP, Wahle BS, Hoss HE, Crabb K, Millard DM, et al. Tumors in long-term rat studies associated with microchip animal identification devices. *Exp Toxicol Pathol* 2001;52(6):483–91.
 67. Le Calvez S, Perron-Lepage M-F, Burnett R. Subcutaneous microchip-associated tumours in B6C3F1 mice: A retrospective study to attempt to determine their histogenesis. *Exp Toxicol Pathol*. 2006;57(4):255–65.
 68. Linder M, Huther S, Reinacher M. In vivo reactions in mice and in vitro reactions in feline cells to implantable microchip transponders with different surface materials. *Vet Rec* 2009;165(2):45–50.
 69. Gruda MC, Pinto A, Craelius A, Davidowitz H, Kopacka WM, Li J, et al. A system for implanting laboratory mice with light-activated microtransponders. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2010;49(6):826–31.
 70. Schutt LK, Turner P V. Microchip-associated sarcoma in a shrew (*Suncus murinus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2010;49(5):638–41.
 71. Hestekin CN, Lin JS, Senderowicz L, Jakupciak JP, O'Connell C, Rademaker A, et al. Blinded study determination of high sensitivity and specificity microchip electrophoresis-SSCP/HA to detect mutations in the p53 gene. *Electrophoresis*. 2011;32(21):2921–9.
 72. Onuki Y, Bhardwaj U, Papadimitrakopoulos F, Burgess D. A review of the

- biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *J Diabetes Sci Technol*. 2008;2(6):1003–15.
73. Williams D. Tissue-biomaterial interactions. *J Mater Sci*. 1987;22(1):3421–45.
 74. Wilson C, Clegg R, Leavesley D, Percy M. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng*. 2005;11(1/2):1–18.
 75. Luttkhuizen D, Harmsen M, Van Luyn M. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng*. 2006;12(7):1955–70.
 76. Frisch S, Screaton R. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(5):555–62.
 77. Jenney C, Anderson J. Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior. *J Biomed Mater Res*. 2000;49(4):435–47.
 78. Clark RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol*. 1982;79(5):264–9.
 79. Wahl S, Wong H, McCartney-Francis N. Role of growth factors in inflammation and repair. *J Cell Biochem*. 1989;40(1):193–9.
 80. Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, Exton M. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol*. 2000;204(1):19–28.
 81. Tang L, Jennings T, Eaton J. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(15):8841–6.
 82. Charo I, Ransohoff R. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006;354(6):610–21.
 83. Simon S, Green C. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng*. 2005;7(1):151–85.
 84. Johnston Jr R. Current concepts: Immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med*. 1988;318(1):747–52.
 85. Rae T. The macrophage response to implant materials. *Crit Rev Biocompat*. 1986;2(1):97–126.
 86. Ziats N, Miller K, Anderson J. In vitro and in vivo Interactions of Cells with Biomaterials. *Biomaterials*. 1988;9(1):5–13.
 87. Berton G, Lowell C. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal*. 1999;11(9):621–35.
 88. Reddig P, Juliano R. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev*. 2005;24(3):425–39.
 89. Esche C, Stellato C, Beck L. Chemokines: Key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*. 2005;125(4):615–28.
 90. Kumar A, Abbas A, Fausto N, Aster J. Robbins and Cotran Pathology Basis of Disease. 9th editio. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2014. 1408 p.
 91. Jenney C, DeFife K, Colton E, Anderson J. Human monocyte/macrophage adhesion, macrophage motility, and IL-4-induced foreign body giant cell formation on silane-modified surfaces in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1998;41(1):171–84.

92. Jenney C, Anderson J. Effects of surface-coupled polyethylene oxide on human macrophage adhesion and foreign body giant cell formation in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1998;44(1):206–16.
93. Brand K, Buoen L, Johnson K. Etiological Factors, Stages, and the Role of the Foreign Body in Foreign Body Tumorigenesis A Review. *Cancer Res.* 1975;35(1):279–86.
94. Sura R, French R, Goldman B, Schwartz D. Neoplasia and Granulomas Surrounding Microchip Transponders in Damaraland Mole Rats (*Cryptomys damarensis*). *Vet Pathol.* 2011;48(4):896–902.
95. Chan J. Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Semin Diagn Pathol.* 2000;17(1):170–7.
96. JS B. Immunohistochemistry in the differential diagnosis of soft tissue tumors. *Monogr Pathol.* 1996;38(1):65–128.
97. Coindre J. Immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumours. *Histopathology.* 2003;43(1):1–16.
98. Ruiz A, Gómez C, Londoño D. Investigación Clínica: Epidemiología Clínica Aplicada. Ruiz-Morales A, editor. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. Centro Editorial Javeriano; 2001. 539 p.
99. Investigaciones V de. Manual de funcionamiento del Bioterio. Facultad de Salud de la Universidad del Valle. Cali; 2011.
100. Colombia C de la R de. Estatuto Nacional de Protección de Animales. República de Colombia.; 1989 p. 15.
101. Salud M de. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Colombia; 1993 p. 12.
102. WSAVA TWSAVA-. Veterinary List of Recommended Microchip Implantation Sites. 1999. p. 5.
103. Salud M de. MPGIRHS. Manual de procedimientos para la gestión integral de residuos hospitalarios y similares en Colombia. 2004.
104. Greenwald S, Brown A. Histology and staining. In: Zouridakis G, Moore J, editors. *Biomedical Technology and Devices Handbook*. London: CRC Press; 2004. p. 1–21.
105. Torres F. Manual de técnicas de histología y anatomía patológica. Grupo Planeta; 2002. 144 p.
106. Suvarna S, Layton C, Bancroft J. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, Expert Consult: Online and Print, 7: Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. Elsevier Health Sciences; 2013. 637 p.
107. Buesa R, Peshkov M. How much formalin is enough to fix tissues? *Ann Diagn Pathol.* 2012;16(1):202–9.
108. Soybir OC, Gürdal SÖ, Oran EŞ, Tülübaş F, Yüksel M, Akyildiz AI, et al. Delayed cutaneous wound healing in aged rats compared to younger ones. *Int Wound J.* 2012;9(5):478–87.
109. Birck MM, Iburg T, Schmidt M, Sangild PT, Hansen a K. A novel method for transuterine identification of piglets. *Lab Anim.* 2008;42(3):331–7.
110. Oviedo Socarras T, Vasconcelos AC, Campos PP, Pereira NB, Souza JPC,

- Andrade SP. Foreign body response to subcutaneous implants in diabetic rats. PLoS One. 2014;9(11).
111. Kastellorizios M, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Prevention of foreign body reaction in a pre-clinical large animal model. J Control Release [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;202:101–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.01.038>
 112. Durán Y, Sánchez M, Súnico N, Misticone S, Chópita M, Oliver M. Patrones histopatológicos de efectos adversos producidos por el uso de materiales de relleno en piel. Dermatol Venez. 2009;3:19–28.

9. ANEXOS

9.1. Descripciones histopatológicas de algunos de los especímenes

1.

Piel con representación hasta músculo estriado.

Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.

Dermis: escasa respuesta linfocitaria dispersa.

Anexos cutáneos: presentes

Cápsula fibrosa: presente entre el tejido celular subcutáneo y el músculo estriado, delgada, con leve inflamación de tipo linfo-plasmocitario.

Células y tejidos pericapsulares: leve respuesta inflamatoria linfo-plasmocitaria periférica focal, tejido fibroconectivo periférico, fibroblastos.

Material extraño peri-implantar: macrófagos cargados de pigmento pardo-amarillo (hemosiderina) y otros aislados con material negruzco granular.

Respuesta inflamatoria: de tipo crónico leve.

Otros cambios dermatopatológicos: proliferación de capilares pericapsulares.

Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantomielocelular.

3.

Piel con representación hasta músculo estriado.

Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.

Dermis: escasa respuesta linfocitaria dispersa.

Anexos cutáneos: presentes

Cápsula fibrosa: presente entre el tejido celular subcutáneo y el músculo estriado, delgada, con leve inflamación de tipo linfo-plasmocitario.

Células y tejidos pericapsulares: leve respuesta inflamatoria linfo-plasmocitaria periférica, tejido fibroconectivo periférico, fibroblastos..

Material extraño peri-implantar: numerosos macrófagos cargados de material negruzco granular. Focalmente hay vacuolas de material traslúcido. (marca).—

Cambios artefactuales en filetes nerviosos.

Respuesta inflamatoria: de tipo crónico leve.

Otros cambios dermatopatológicos: proliferación de capilares pericapsulares.

Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantomielocelular.

4.

Piel con representación hasta músculo estriado.

Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.

Dermis: escasa respuesta linfocitaria dispersa.

Anexos cutáneos: presentes, escasos.

Cápsula fibrosa: presente en músculo estriado, delgada, con leve inflamación de tipo linfo-plasmocitario.

Células y tejidos pericapsulares: moderada respuesta inflamatoria linfo-plasmocitaria periférica, ocasionales PMN, abundante tejido fibroconectivo periférico, fibroblastos.

Material extraño peri-implantar: algunos macrófagos cargados con material negruzco granular y otros con pigmento pardo amarillo.

Respuesta inflamatoria: de tipo crónico moderada.
Otros cambios dermatopatológicos: proliferación de capilares pericapsulares.
Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantocelular.

5.

Piel con representación hasta tejido celular subcutáneo.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: engrosada,
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: presente en tejido celular subcutáneo, delgada, con leve inflamación de tipo linfo-plasmocitario, algunos macrófagos cargados de pigmento amarillento.
Células y tejidos pericapsulares: moderada respuesta inflamatoria linfo-plasmocitaria periférica, ocasionales PMN, abundante tejido fibroconectivo periférico, tejido adiposo, fibroblastos, hemorragia y edema intersticial.
Material extraño peri-implantar: no
Respuesta inflamatoria: de tipo crónico moderada.
Otros cambios dermatopatológicos: proliferación de capilares pericapsulares.
Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantocelular.

6.

Piel con representación hasta tejido músculo estriado.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: engrosada,
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: presente en tejido celular subcutáneo, delgada, con leve inflamación de tipo linfo-plasmocitario.
Células y tejidos pericapsulares: mínima respuesta inflamatoria linfo-plasmocitaria periférica, numerosos macrófagos cargados de material negruzco granular.
Material extraño peri-implantar: si
Respuesta inflamatoria: de tipo crónico leve.
Otros cambios dermatopatológicos: proliferación de capilares pericapsulares.
Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantocelular.

8.

Piel con representación hasta tejido músculo estriado.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: engrosada,
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: presente en músculo estriado, delgada, con leve infiltrado linfo-plasmocitario.
Células y tejidos pericapsulares: mínima respuesta inflamatoria linfo-plasmocitaria periférica, tejido fibroconectivo y adiposo.
Material extraño peri-implantar: si

Respuesta inflamatoria: de tipo crónico leve.
Otros cambios dermatopatológicos: proliferación de capilares pericapsulares.
Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantocelular.

10.

Piel con representación hasta músculo estriado y tejido celular subcutáneo.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: engrosada, ocasionales linfocitos dispersos.
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: ausente
Células y tejidos pericapsulares: -
Material extraño peri-implantar: -
Respuesta inflamatoria: de tipo crónico leve.
Otros cambios dermatopatológicos: infiltrado inflamatorio de tipo linfoplasmocitario leve en el tejido celular subcutáneo, con algunos macrófagos cargados de material negruzco granular, hemorragia.
Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantocelular.

11.

Piel con representación hasta músculo estriado y tejido celular subcutáneo.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: engrosada, ocasionales linfocitos dispersos.
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: presente en el tejido celular subcutáneo, delgada, con mínimo infiltrado linfocitario.
Células y tejidos pericapsulares: leve respuesta inflamatoria linfoplasmocitaria periférica, numerosos macrófagos cargados de material negruzco granular.
Material extraño peri-implantar: no
Respuesta inflamatoria: de tipo crónico leve.
Otros cambios dermatopatológicos: proliferación de capilares pericapsulares.
Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantocelular.

12.

Piel con representación hasta músculo estriado y tejido celular subcutáneo.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: engrosada, ocasionales linfocitos dispersos.
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: ausente
Células y tejidos pericapsulares: -
Material extraño peri-implantar: -
Respuesta inflamatoria: -

Otros cambios dermatopatológicos: -

13.

Piel con representación hasta tejido celular subcutáneo.

Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.

Dermis: engrosada, ocasionales linfocitos dispersos.

Anexos cutáneos: presentes.

Cápsula fibrosa: presente en el tejido celular subcutáneo, ligeramente gruesa, con leve infiltrado inflamatorio linfo-plasmocitario, abundantes macrófagos cargados de pigmento pardo-amarillo (hemosiderina).

Células y tejidos pericapsulares: abundante tejido fibroconectivo, moderada respuesta inflamatoria linfo-plasmocitaria periférica, hemorragia.

Material extraño peri-implantar: no

Respuesta inflamatoria: de tipo crónico moderada.

Otros cambios dermatopatológicos: proliferación de capilares pericapsulares.

Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantocelular.

15.

Piel con representación hasta músculo estriado.

Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.

Dermis: engrosada, ocasionales linfocitos dispersos.

Anexos cutáneos: presentes.

Cápsula fibrosa: presente en el tejido celular subcutáneo, delgada, sin cambios inflamatorios.

Células y tejidos pericapsulares: abundante tejido fibroadiposo, leve respuesta inflamatoria linfo-plasmocitaria periférica, numerosos macrófagos cargados de material negruzco granular.

Material extraño peri-implantar: no

Respuesta inflamatoria: de tipo crónico leve.

Otros cambios dermatopatológicos: proliferación de capilares pericapsulares.

Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantocelular.

16.

Piel con representación hasta músculo estriado y tejido celular subcutáneo.

Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.

Dermis: engrosada

Anexos cutáneos: presentes.

Cápsula fibrosa: ausente (no representada?)

Células y tejidos pericapsulares: -

Material extraño peri-implantar: -
Respuesta inflamatoria: -
Otros cambios dermatopatológicos: infiltrado inflamatorio de tipo linfoplasmocitario leve en el tejido celular subcutáneo.

15.

Piel con representación hasta tejido celular subcutáneo y focalmente músculo estriado.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: engrosada, leve respuesta inflamatoria de tipo linfocitaria.
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: presente en el tejido celular subcutáneo, delgada, con leve infiltrado mononuclear de predominio linfocitario.
Células y tejidos pericapsulares: abundante tejido fibroadiposo, moderada respuesta inflamatoria linfoplasmocitaria periférica, algunos macrófagos cargados de material negrozco granular.
Material extraño peri-implantar: no
Respuesta inflamatoria: de tipo crónico moderada.
Otros cambios dermatopatológicos: marcada proliferación de capilares pericapsulares. Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantocelular.

19.

Piel con representación hasta tejido celular subcutáneo y músculo estriado.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: delgada, algunos linfocitos dispersos.
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: ausente
Células y tejidos pericapsulares: -
Material extraño peri-implantar: -
Respuesta inflamatoria: -
Otros cambios dermatopatológicos: -

20.

Piel con representación hasta músculo estriado.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: engrosada, ocasionales linfocitos dispersos.
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: presente en el tejido celular subcutáneo, delgada, sin cambios inflamatorios.
Células y tejidos pericapsulares: escaso tejido fibroconectivo periférico,

mínima respuesta inflamatoria linfo-plasmocitaria periférica.
Material extraño peri-implantar: no
Respuesta inflamatoria: de tipo crónico mínima
Otros cambios dermatopatológicos: Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantocelular.

21.

Piel con representación hasta músculo estriado.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: engrosada, ocasionales linfocitos dispersos.
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: ausente
Células y tejidos pericapsulares: -
Material extraño peri-implantar: -
Respuesta inflamatoria: -.
Otros cambios dermatopatológicos: -
Comentario: presenta cambios artefactuales por el proceso, tejido plegado.

22.

Piel con representación hasta músculo estriado.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: engrosada, ocasionales linfocitos dispersos.
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: ausente (no representada)
Células y tejidos pericapsulares: -
Material extraño peri-implantar: -
Respuesta inflamatoria: de tipo linfo-plasmocitaria leve en el tejido celular subcutáneo, con hemorragia.
Otros cambios dermatopatológicos: -

23.

Piel con representación hasta músculo estriado.
Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.
Dermis: engrosada, ocasionales linfocitos dispersos.
Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: presente en el tejido celular subcutáneo, delgada, sin cambios inflamatorios.

Células y tejidos pericapsulares: abundante tejido fibroconectivo, moderada respuesta inflamatoria linfo-plasmocitaria periférica, abundantes macrófagos cargados de material negrozco granular.

Material extraño peri-implantar: no

Respuesta inflamatoria: de tipo crónico leve.

Otros cambios dermatopatológicos: marcada proliferación de capilares pericapsulares. Sin respuesta de tipo granulomatosa o gigantocelular.

25.

Piel con representación hasta tejido celular subcutáneo.

Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.

Dermis: engrosada, ocasionales linfocitos dispersos.

Anexos cutáneos: presentes.

Cápsula fibrosa: ausente

Células y tejidos pericapsulares: -

Material extraño peri-implantar: -

Respuesta inflamatoria: -

Otros cambios dermatopatológicos: infiltrado inflamatorio de tipo linfo-plasmocitario leve en el tejido celular subcutáneo.

26.

Piel con representación hasta músculo estriado.

Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.

Dermis: engrosada sin cambios inflamatorios.

Anexos cutáneos: presentes.

Cápsula fibrosa: ausente

Células y tejidos pericapsulares: -

Material extraño peri-implantar: -

Respuesta inflamatoria: -

Otros cambios dermatopatológicos: -

28.

Piel con representación hasta músculo estriado.

Epidermis: sin alteraciones, células epiteliales sin atipia.

Dermis: engrosada, ocasionales linfocitos dispersos.

Anexos cutáneos: presentes.
Cápsula fibrosa: ausente
Células y tejidos pericapsulares: -
Material extraño peri-implantar: -
Respuesta inflamatoria: leve infiltrado inflamatorio en el tejido celular subcutáneo, con algunos macrófagos cargados de material negrozco granular.
Otros cambios dermatopatológicos: -

9.2. Procedimientos Operacionales Estandarizados (POEs)

9.2.1. Protocolo de implantación de microchip RFID

	PROTOCOLO DE IMPLANTACIÓN SUBCUTÁNEA DE UN MICROCHIP RFID PASIVO RECUBIERTO CON PARYLENE C	SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA	
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID en la región interescapular para ratas de la cepa Wistar
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM - AA
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM - AA
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM - AA

1. OBJETIVOS

Implantar un microchip RFID pasivo recubierto con Parylene C, en la piel de la región interescapular de la rata Wistar.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID pasivos de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

4. MATERIALES

4.1. ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Bata.
- Guantes desechables.
- Tapa boca.

4.2. EQUIPOS

- Careta plástica no ajustable.
- Cánula de inyección manual con microchip RFID pasivo contenido.
- Verichip Pocket Reader

4.3. REACTIVOS

Anestésicos:

- Isoflurano 100%.

Biológico:

- Rata Wistar de cualquier edad (para este estudio se emplearon ratas de 5 meses de edad).

5. PROCEDIMIENTO

- Posicione el biomodelo en la mesa de trabajo sobre una superficie lisa, preferiblemente metálica, de fácil limpieza y manipulación posterior al procedimiento.
- Ubique la región interescapular haciendo una palpación profunda entre las dos escapulas de anterior a posterior y de medial a lateral.
- Coja la cola del biomodelo y llévela hacia la cabeza, haciendo un agarre en nuca que le permita inmovilizar al biomodelo.
- Inserte dentro de la careta plástica, una mota de algodón impregnada con 5mL de Isoflurano 100% e inserte el hocico del biomodelo dentro de la careta, manténgalo inmovilizado.
- Limpie con una solución desinfectante tipo yodopovidona la superficie de piel a implantar, impregnando una mota y pasándola con movimientos controlados sobre el pelaje y piel del animal.
- Retire la cánula del empaque plástico donde previamente esterilizada
- Retire la tapa de protección de la aguja de la cánula.
- En el biomodelo, estire la piel de la región donde hará la implantación y ubique la punta del bisel de la cánula tocando la piel y dirigido hacia abajo. Entre el biomodelo y la cápsula debe haber un plano de inserción paralelo entre los dos, evitando angulaciones que puedan generar lesión en otras regiones.
- Inserte en un intento la cánula por una extensión de 2 centímetros.
- En posición, lleve el embolo de la cánula hacia delante para que el microchip RFID pasivo quede insertado dentro de la piel del biomodelo.
- Retire con cuidado la cánula de la piel y retire la careta.
- Verifique con palpación que el microchip RFID pasivo esté en posición y escanéelo con el escáner Verichip Pocket Reader y verifique que el número de serie emitido (número de 16 dígitos) coincida con el número de guía presente en el empaque de la cánula y los adhesivos que esta trae.

- Ubique un adhesivo con el código en el container de almacenamiento del biomodelos.
- Pegue otro adhesivo en la hoja de vida del biomodelo.
- Verifique que el biomodelo recupere la conciencia y se vea orientado en el espacio.
- Limpie toda el área de trabajo y registre novedades en la hoja de vida del biomodelo si estás llegaron a pasar.

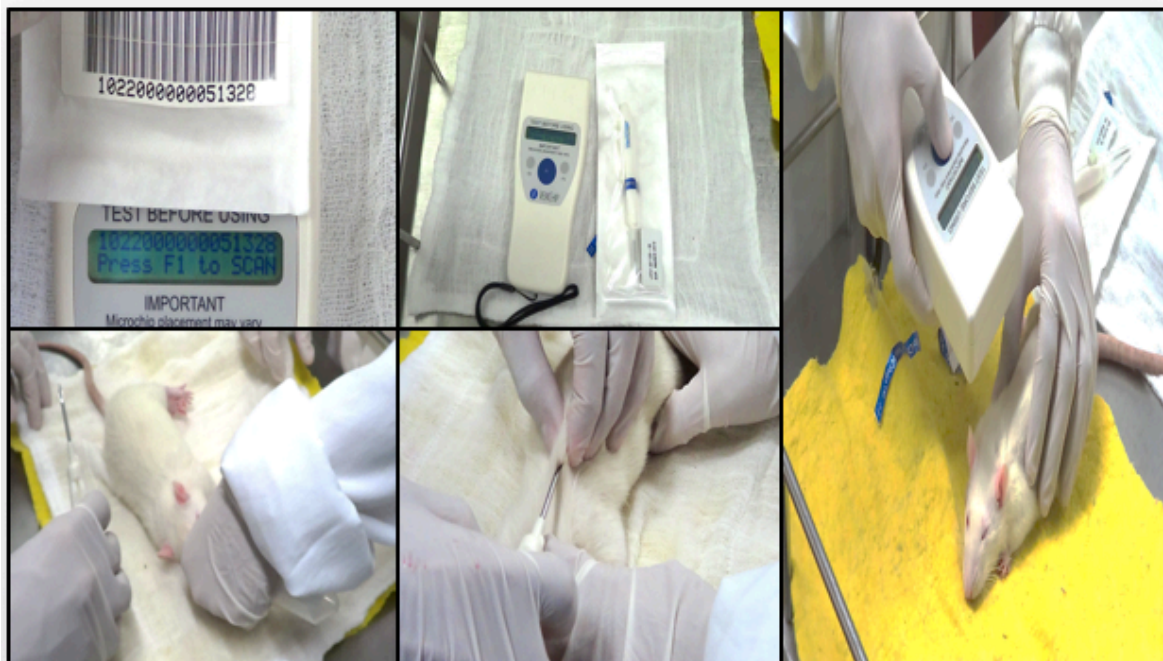


Figura. Procedimiento de implantación.

9.2.2. Protocolo de implantación cápsula de vidrio inerte

	PROTOCOLO DE IMPLANTACIÓN SUBCUTÁNEA DE UNA CÁPSULA DE VIDRIO INERTE	SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA	
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID pasivo en la región interescapular para ratas de la cepa Wistar
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM - AA
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM - AA
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM - AA

1. OBJETIVOS

Implantar un microchip RFID pasivo recubierto con Parylene C, en la piel de la región interescapular de la rata Wistar.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID pasivo de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

4. MATERIALES

4.1. ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Bata, guantes desechables, Tapa boca.

4.2. EQUIPOS

- Careta plástica no ajustable.
- Cánula de inyección manual con cápsula de vidrio.

4.3. REACTIVOS

Anestésicos:

- Isoflurano 100%.

Biológico:

- Rata Wistar de cualquier edad (para este estudio se emplearon ratas de 5 meses de edad).

5. PROCEDIMIENTO

- Posicione el biomodelo en la mesa de trabajo sobre una superficie lisa, preferiblemente metálica, de fácil limpieza y manipulación posterior al procedimiento.
- Ubique la región interescapular haciendo una palpación profunda entre las dos escapulas de anterior a posterior y de medial a lateral.
- Coja la cola del biomodelo y llévela hacia la cabeza, haciendo un agarre en nuca que le permita inmovilizar al biomodelo.
- Inserte dentro de la careta plástica, una mota de algodón impregnada con 5mL de Isoflurano 100% e inserte el hocico del biomodelo dentro de la careta, manténgalo inmovilizado.
- Limpie con una solución desinfectante tipo yodopovidona la superficie de piel a implantar, impregnando una mota y pasándola con movimientos controlados sobre el pelaje y piel del animal.
- Retire la cánula del empaque plástico donde previamente esterilizada
- Retire la tapa de protección de la aguja de la cánula.
- En el biomodelo, estire la piel de la región donde hará la implantación y ubique la punta del bisel de la cánula tocando la piel y dirigido hacia abajo. Entre el biomodelo y la cápsula debe haber un plano de inserción paralelo entre los dos, evitando angulaciones que puedan generar lesión en otras regiones.
- Inserte en un intento la cánula por una extensión de 2 centímetros.
- En posición, lleve el embolo de la cánula hacia delante para que la cápsula de vidrio inerte quede insertado dentro de la piel del biomodelo.
- Retire con cuidado la cánula de la piel y retire la careta.
- Verifique con palpación que la cápsula de vidrio esté en posición y marque el container de almacenamiento del biomodelo con el número respectivo de biomodelo.
- Llene el número de biomodelo en la hoja de vida del biomodelo.
- Verifique que el biomodelo recupere la conciencia y se vea orientado en el espacio.
- Limpie toda el área de trabajo y registre novedades en la hoja de vida del biomodelo si estás llegaron a pasar.

9.2.3. Protocolo de punción sin implantación

 Universidad del Valle	PROTOCOLO DE PUNCIÓN EN PIEL DE RATA WISTAR		SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA		
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID en la región interescapular para pasivo ratas de la cepa Wistar	
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM - AA	
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM - AA	
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM - AA	

1. OBJETIVOS

Implantar un microchip RFID pasivo recubierto con Parylene C, en la piel de la región interescapular de la rata Wistar.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID pasivo de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

4. MATERIALES

4.1. ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Bata.
- Guantes desechables.
- Tapa boca.

4.2. EQUIPOS

- Careta plástica no ajustable.
- Cánula de inyección manual.

4.3. REACTIVOS

Anestésicos:

- Isoflurano 100%.

Biológico:

- Rata Wistar de cualquier edad (para este estudio se emplearon ratas de 5 meses de edad).

5. PROCEDIMIENTO

- Posicione el biomodelo en la mesa de trabajo sobre una superficie lisa, preferiblemente metálica, de fácil limpieza y manipulación posterior al procedimiento.
- Ubique la región interescapular haciendo una palpación profunda entre las dos escapulas de anterior a posterior y de medial a lateral.
- Coja la cola del biomodelo y llévela hacia la cabeza, haciendo un agarre en nuca que le permita inmovilizar al biomodelo.
- Inserte dentro de la careta plástica, una mota de algodón impregnada con 5mL de Isoflurano 100% e inserte el hocico del biomodelo dentro de la careta, manténgalo inmovilizado.
- Limpie con una solución desinfectante tipo yodopovidona la superficie de piel a implantar, impregnando una mota y pasándola con movimientos controlados sobre el pelaje y piel del animal.
- Retire la cánula del empaque plástico donde previamente esterilizada
- Retire la tapa de protección de la aguja de la cánula.
- En el biomodelo, estire la piel de la región donde hará la implantación y ubique la punta del bisel de la cánula tocando la piel y dirigido hacia abajo. Entre el biomodelo y la cápsula debe haber un plano de inserción paralelo entre los dos, evitando angulaciones que puedan generar lesión en otras regiones.
- Inserte en un intento la cánula por una extensión de 2 centímetros.
- Retire con cuidado la cánula de la piel y retire la careta.
- Marque el container de almacenamiento del biomodelo con el número respectivo de biomodelo.
- Llene el número de biomodelo en la hoja de vida del biomodelo.
- Verifique que el biomodelo recupere la conciencia y se vea orientado en el espacio.
- Limpie toda el área de trabajo y registre novedades en la hoja de vida del biomodelo si estás llegaron a pasar.

9.2.4. Protocolo de verificación de lectura de microchip RFID pasivo

	PROTOCOLO DE VERIFICACIÓN DE LECTURA DE MICROCHIP RFID	SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA	
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID pasivo en la región interescapular para ratas de la cepa Wistar
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM – AA
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM – AA
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM – AA

1. OBJETIVOS

Comprobar el funcionamiento de un microchip RFID pasivo recubierto con Parylene C, en la piel de la región interescapular de la rata Wistar y corroborar los datos de identidad según el número de serie.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID pasivo de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

4. MATERIALES

4.1. ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Bata.
- Guantes desechables.
- Tapa boca.

4.2. EQUIPOS

Verichip Pocket Reader

- Careta plástica no ajustable.
- Cánula de inyección manual.

5. PROCEDIMIENTO

- Posicione el biomodelo en la mesa de trabajo sobre una superficie lisa, preferiblemente metálica, de fácil limpieza y manipulación posterior al procedimiento.
- Ubique la región interescapular haciendo una palpación profunda entre las dos escapulas de anterior a posterior y de medial a lateral.
- Encienda el Verichip Pocket Reader del botón central con la letra F1 y espere a que en la pantalla muestre el aviso "Press F1 to SCAN".
- Presione el botón F1.
- Pase el cabezal del Verichip Pocket Reader sobre la región implantada en el biomodelo.
- Cuando sea identificado el microchip, el Verichip Pocket Reader emitirá una corta señal sonora y observará en la pantalla un número de 16 dígitos que corresponde al número de identificación.
- Contraste este número con los números que se encuentran en el container de almacenamiento del biomodelo y con el de la hoja de vida.
- Regrese el biomodelo a su lugar de descanso.
- Apague el Verichip Pocket Reader oprimiendo simultáneamente los botones grises F2 y F3.
- Limpie toda el área de trabajo y registre novedades en la hoja de vida del biomodelo si estás llegaron a pasar.

9.2.5. Protocolo de eutanasia de biomodelos

	PROTOCOLO DE EUTANASIA DE BIOMODELOS	SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA	
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID pasivo en la región interescapular para ratas de la cepa Wistar
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM - AA
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM - AA
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM - AA

1. OBJETIVOS

Lograr la eutanasia de una rata Wistar con el mínimo sufrimiento por parte del biomodelo y bajo condiciones de laboratorio controladas.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID pasivos de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

4. MATERIALES

4.1. ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Bata.
- Guantes desechables.
- Tapa boca.

4.2. EQUIPOS

- Campana de vidrio

4.3. REACTIVOS

Anestésicos:

- Isoflurano 100%.

Biológico:

- Rata Wistar de cualquier edad (para este estudio se emplearon ratas de 5 meses de edad).

5. PROCEDIMIENTO

- Posicione el biomodelo en la mesa de trabajo sobre una superficie lisa, preferiblemente metálica, de fácil limpieza y manipulación posterior al procedimiento.
- Impregnar una mota de algodón con 10mL de Isoflurano al 100% (*Isoflurano USP® Baxter®*) y exponer al biomodelo dentro de una campana de vidrio sellada. La concentración del vapor desarrolla una concentración tóxica que generara parálisis muscular, falla cardio-respiratoria y muerte del biomodelo, en un periodo aproximado de 10 minutos
- Verifique dentro de esos 10 minutos: el cese de la respiración, la ausencia de latidos cardiacos, la presentación de córnea opaca y relajación de esfínteres
- En presencia de estos signos de muerte, ya puede realizar la biopsia.
- Cuando finalice el procedimiento quirúrgico, deposite el biomodelo en el congelador de residuos biológicos dentro en una bolsa roja para luego entregarla a la ruta hospitalaria de acuerdo con el protocolo de manejo de residuos anatómo-patológicos del Departamento de Morfología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle y el PGIRS adoptado por la Universidad del Valle.

9.2.6. Protocolo de obtención de biopsia de piel de rata Wistar

	PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE BIOPSIA DE PIEL DE RATA WISTAR	SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA	
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID pasivo en la región interescapular para ratas de la cepa Wistar
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM - AA
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM - AA
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM - AA

1. OBJETIVOS

Obtener una biopsia de piel de rata Wistar con un dispositivo implantado a nivel subcutáneo.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID pasivos de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

4. MATERIALES

4.1. MATERIALES

- Bandeja quirúrgica (1)
- Frascos herméticos (6)
- Hoja de bisturí No. 15 (2)
- Cuchilla Minora (2)
- Formol buferado 10%
- Guantes
- Tapabocas

- Bata
- Gorro
- Deposito con jabón enzimático

4.2. INSTRUMENTAL

- Pinza adson con garra (1)
- Pinza adson sin garra (1)
- Mango de Bisturí Bard Parker (1)
- Periostotomo (1)
- Alfileres (4)

4.3. REACTIVOS

Biológico:

- Rata Wistar de cualquier edad (para este estudio se emplearon ratas de 5 meses de edad).

5. PROCEDIMIENTO

- Posterior a la eutanasia y manipulación del biomodelo por parte del investigador responsable del mismo, proceda a hacer la identificación de las condiciones en las cuales se recibe el biomodelo para definir si es o no apto para la biopsia. Este punto está condicionado única y exclusivamente a la presencia del Microchip RFID pasivo o la cápsula de vidrio, si en cierto caso, el dispositivo no se encuentra en posición y migrado a otra región del cuerpo, descarte el biomodelo.
- Aprobado el biomodelo, haga la tricotomía en la región dorsal de piel del biomodelo de donde se obtendrá la muestra, procurando no perforar o lacerar la superficie cutánea.
- Proceda a hacer una incisión horizontal profunda que pase por los dos extremos craneales de las escapulas, igualmente haga una incisión horizontal profunda totalmente paralela a la realizada anteriormente y asegúrese que esta pase por los bodes o extremo inferior de cada una de las escapulas. Para terminar el diseño del colgajo, realice dos incisiones verticales que unan los extremos de las incisiones horizontales y sean perpendiculares con estas y paralelas entre sí, obteniendo una muestra con forma cuadrangular.
- Levante el colgajo progresivamente con las pinzas desde la profundidad delimitada por las incisiones hechas y retire la piel junto con el panículo adiposo y el panículo carnosos. Empiece este procedimiento desde la incisión horizontal superior, hasta la incisión horizontal inferior. Use la pinza adson sin garra para manipular el colgajo de una forma segura.
- Lleve la muestra (el colgajo libre de piel) a una bandeja para lavarla y quitarle cualquier elemento que contamine la muestra y su posterior procesamiento

- Sumerja la muestra en el frasco de conservación que ya tendrá la solución fijadora y que debe estar en una relación 1:10, cubriendo por completo la muestra. Rotule el frasco con la identidad del biomodelo, el tipo de solución fijadora y la fecha.
- Cuando finalice el procedimiento quirúrgico, deposite el biomodelo en el congelador de residuos biológicos dentro en una bolsa roja para luego entregarla a la ruta hospitalaria de acuerdo con el protocolo de manejo de residuos anatómo-patológicos del Departamento de Morfología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle y el PGIRS adoptado por la Universidad del Valle.
- El instrumental manipulado debe ser sumergido en una preparación de jabón enzimático con el fin de hacer la limpieza inicial, antes de hacer la esterilización el equipo, hágalo cuando finalice todos los pasos descritos previamente.

Durante el procedimiento debe tomarse un registro fotográfico de cada paso, por lo que será necesaria la asistencia de otra persona que pueda llevar este registro.

9.2.7. Protocolo de fijación de biopsia de piel de rata Wistar

	PROTOCOLO DE FIJACIÓN QUÍMICA DE BIOPSIA DE PIEL DE RATA WISTAR	SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA	
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID pasivo en la región interescapular para ratas de la cepa Wistar
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM - AA
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM - AA
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM - AA

1. OBJETIVOS

Obtener una biopsia de piel de rata Wistar con un dispositivo implantado a nivel subcutáneo.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID pasivos de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

Materiales

- Frascos herméticos (6)
- Formol buferado 10% (hasta 500mL)
- Solución de Bouin
- Etiquetas adhesivas

Instrumental

- Pinza adson sin garra (2)

Procedimiento

- Terminado el procedimiento de disección y realizada la división de la muestra en secciones más pequeñas, se pasará a hacer la inmersión dentro del

agente fijador de cada una de las secciones de la muestra. Previo al procedimiento quirúrgico, debió haber sido preparado un volumen estimado de 500mL de formol buferado al 10%.

- Se deposita cada segmento de la muestra dentro del contenedor hermético en una relación 1:10. El volumen de cada segmento será determinado siguiendo el principio de Arquímedes que plantea: “Un cuerpo total o parcialmente sumergido en un fluido en reposo, recibe un empuje de abajo hacia arriba igual al peso del volumen del fluido que desaloja”.
- Se debe asegurar que la tapa cierre de forma adecuada para evitar la evaporización y contaminación del agente fijador.
- Cada frasco hermético deberá llevar un rotulo con las siguientes especificaciones:
 - Fecha
 - Tipo de fijador
 - Código
- La preparación del formol buferado al 10% se realizará de la siguiente forma:

A. Preparación formol buferado

Reactivos:

- | | |
|----------------------------|---------|
| • Formol al 37% | 50mL |
| • Agua destilada | 450mL |
| • Sodio-fosfato monobásico | 0,2gr |
| • Sodio-fosfato dibásico | 0,325gr |

Manejo:

- Se hace la dilución del formol al 37% en el agua destilada.
- Se adiciona una por una las sales, dejando que se diluya totalmente una antes de adicionar la otra en el proceso de mezcla. Se emplea el agitador magnético. Cuando desaparece cualquier precipitado en el fondo del envase donde está contenida la solución, se asume que ya está diluida la sal.
- Por ser un compuesto altamente toxico y volátil, se conserva en frasco(s) totalmente hermético(s) de vidrio o plástico.
- La manipulación del formol ya preparado debe hacer preferiblemente dentro de una campana de aire para evitar exposición del operador al compuesto.

9.2.8. Protocolo de procesamiento histoquímico de las muestras de piel

	PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO HISTOQUÍMICO DE BIOPSIA DE PIEL DE RATA WISTAR	SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA	
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID pasivos en la región interescapular para ratas de la cepa Wistar
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM - AA
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM - AA
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM - AA

1. OBJETIVOS

Obtener una biopsia de piel de rata Wistar con un dispositivo implantado a nivel subcutáneo.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID pasivos de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

9.2.9. Protocolo de tinción para hematoxilina eosina

	PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO HISTOQUÍMICO DE BIOPSIA DE PIEL DE RATA WISTAR	SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA	
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID en la región interescapular para ratas de la cepa Wistar
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM - AA
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM - AA
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM - AA

1. OBJETIVOS

Obtener una biopsia de piel de rata Wistar con un dispositivo implantado a nivel subcutáneo.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

9.2.10 Protocolo de tinción para Tricrómica de Masson

 Universidad del Valle	PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA TRICRÓMICO DE MASSON		SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA		
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID pasivos en la región interescapular para ratas de la cepa Wistar	
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM - AA	
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM - AA	
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM - AA	

1. OBJETIVOS

Lograr una tinción adecuada por medio de la coloración Tricrómica de Masson para la observación de muestras de piel de rata Wistar.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID pasivos de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

4. MATERIALES

4.1. ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Bata.
- Guantes desechables.
- Tapa boca.

4.2. OTROS MATERIALES

- Guantes para manejo de elementos calientes
- Recipientes para descartar los desechos
- Coplin
- Batería de reactivos para Tricrómica de Masson

4.2. EQUIPOS

- Campana de extracción de gases
- Cronómetro temporizador
- Balanza Digital
- Horno
- agitador magnético

5. PROCEDIMIENTO

5.1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Debido al manejo de sustancias tóxicas y potencialmente tóxicas, revise las fichas técnicas de los componentes; utilice indumentaria de seguridad: Gorro, tapabocas, gafas de seguridad, bata anti fluidos de manga larga y puño ajustado, zapato cerrado, Guantes para manejo de elementos calientes.

Realice la preparación de los reactivos y de la batería en la campana extractora.



5.1.1. Fijador de Bouin (1050 mL) en el caso de muestras fijadas inicialmente con formol buferado o formalina.

Solución acuosa de ácido pícrico 1.9%	750 mL
Formol puro	250 mL
Ácido acético glacial	50 mL

5.1.2. Hematoxilina Férrica de Weigert (100 mL)

Solución A:

Cristales de hematoxilina	2 g
Alcohol 95%	50 mL

Solución B:

Cloruro férrico solución acuosa 29%	2 mL
Agua destilada	47,5 mL
Ácido clorhídrico	0,5 mL

Solución de trabajo Hematoxilina Férrica de Weigert

Se mezclan partes iguales de la solución A sobre la B.

Nota: Esta preparación es estable hasta por 3 meses.

5.1.3. Solución Scarlet Brebrich y fucsina ácida (100 mL)

Solución acuosa al 1% de Briebrich Scarlet	90 mL
Solución al 0.01% de fucsina ácida	9 mL
Ácido acético glacial	1 mL

5.1.4. Ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (100 mL)

Ácido fosfomolibdico 5 %	2,5 g
Ácido fosfotúngstico 5 %	2,5 g
Agua destilada	100 mL

5.1.5. Anilina azul (100 mL)

Anilina azul.....	2,5 g
Ácido acético glacial.....	2,5 mL
Agua destilada.....	97,5 mL

5.1.6. Solución de Ácido acético al 1% (100 mL)

Ácido acético glacial.....	1 mL
Agua destilada.....	99 mL

Debe utilizar la campana extractora para la preparación de reactivos y de la batería de Tricrómica

5.2. PREPARACIÓN DE LA BATERÍA

Llene los 20 contenedores bajo la campana extractora, y se organizaron en orden:



- Contenedor 1 (xilol).
- Contenedor 2 (xilol).
- Contenedor 3 (alcohol 100%).
- Contenedor 4 (alcohol 100%).
- Contenedor 5 (alcohol 95%).
- Contenedor 6 (alcohol 95%).
- Contenedor 7 (alcohol 70%).
- Agua (fluyendo en contenedor de agua).
- Contenedor 8 (Hematoxilina férrica de Weigert).
- Contenedor para enjuague con agua corriente.
- Contenedor 9 (Briebrich Scarlet-fucsina ácida).
- Contenedor 10 (Agua destilada).
- Contenedor 11 (ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico).
 - **Nota: la solución de fosfoácidos se desacarta después de su uso).**
- Contenedor 12 (Anilina azul).
 - **Lavado inicialmente en agua destilada y luego en agua corriente**
- Contenedor 13 (ácido acético 1%).
 - **Nota: la solución de ácido acético se desacarta después de su uso).**
- Contenedor 14 (alcohol 95%).
- Contenedor 15 (alcohol 95%).
- Contenedor 16 (alcohol 100%).
- Contenedor 17 (alcohol 100%).
- Contenedor 18 (xilol).
- Contenedor 19 (xilol).
- Contenedor 20 (xilol).

Realice la siguiente secuencia teniendo en cuenta los siguientes tiempos para cada paso:

PASO	TIEMPO	PASO	TIEMPO
1- Xilol (1)	3 min	13- Briebrich Scarlet-fucsina ácida	2 min
2- Xilol (2)	3 min	14- Agua destilada	3 min
3- Alcohol 100% (1)	3 min	15- Ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico	15min
4- Alcohol 100% (2)	3 min	16- Anilina azul	5 min
5- Alcohol 95% (1)	3 min	17- Agua destilada	3 min
6- Alcohol 95% (2)	3 min	18- Ácido acético 1%	3 min
7- Alcohol 70%	3 min	19- Alcohol 95% (1)	3 min
8- Agua destilada	3 min – hacer 3 cambios	20- Alcohol 95% (2)	3 min
9- Solución de Bouin	60 min a 60°C y dejar enfriar	21- Alcohol 100% (1)	3 min
10- Agua (corriente)	Hasta que aclaren los tejidos	22- Alcohol 100% (2)	3 min
11- Hematoxilina férrica de Weigert	15 min	23- Xilol (1)	3 min
12- Agua (corriente)	3 min	24- Xilol (2)	3 min

A continuación, puede hacer el montaje y la observación de las placas teñidas con esta tinción.

9.2.11. Protocolo de observación y toma de imágenes histológica de piel

	PROTOCOLO DE OBSERVACIÓN Y TOMA DE IMÁGENES HISTOLÓGICAS DE BIOPSIA DE PIEL DE RATA WISTAR		SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA		
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID pasivos en la región interescapular para ratas de la cepa Wistar	
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM - AA	
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM - AA	
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM - AA	

1. OBJETIVOS

Obtener una biopsia de piel de rata Wistar con un dispositivo implantado a nivel subcutáneo.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID pasivos de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

9.2.12. Protocolo de mediciones para grosor de cápsula fibrosa

	PROTOCOLO DE MEDICIONES PARA GROSOR DE CÁPSULA FIBROSA POR MEDIO DE SOFTWARE DE ANÁLISIS DE IMÁGENES	SELLO SECO
	DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA	
UNIDAD: Departamento de Morfología – Sección de Histología		PROCESO: Implantación de un microchip RFID en la región interescapular para ratas de la cepa Wistar
REVISADO POR: Freddy Moreno Gómez		FECHA DE CREACIÓN: DD – MM - AA
APROBADO POR:		FECHA DE APROBACIÓN: DD – MM - AA
REALIZADO POR: SEBASTIÁN MEDINA CARDENAS		FECHA DE REALIZACIÓN: DD – MM - AA

1. OBJETIVOS

Obtener una biopsia de piel de rata Wistar con un dispositivo implantado a nivel subcutáneo.

2. ALCANCE

Este procedimiento está dirigido a todo las personas interesadas en hacer o participar en investigaciones destinadas al estudio de cuerpos extraños tipo microchips RFID de implantación subcutánea para la descripción y evaluación de cambios macroscópicos y microscópicos en la piel, derivados de la presencia de dicho cuerpo extraño.

3. AUTORIDAD Y RESPONSABILIDAD

El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento, y la responsabilidad es de la persona que realice el procedimiento.

9.3. Base de datos biomodelos

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	Biomodelo	Grupo experimental	Tiempo de implantación (meses)	Material de recubrimiento	Epidermis	Dermis	Inflamación tejido adiposo	Panículo caroso	Capota fibrosa/corosa/um	Inflamación pericapsular	Tipo de inflamación	Tipo de células	Reacción a cuerpo extraño/Material extraño per/implantar		
2	1	Intervención experimental	2	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Gránulos de hemiderma, material biorefrigente	Si	
3	1	Intervención experimental	2	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Gránulos de hemiderma, material biorefrigente	No	
4	2	Intervención experimental	4	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material negrozo granular	No	
5	2	Intervención experimental	4	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material negrozo granular	No	
6	3	Intervención experimental	6	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material negrozo granular, material biorefrigente	No	
7	3	Intervención experimental	6	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico moderada	Infiltrado linfoplasmocitario; macrófagos	Gránulos de hemiderma, material biorefrigente	No	
8	4	Intervención experimental	8	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico moderada	Infiltrado linfoplasmocitario; PAN	Material negrozo granular	No	
9	4	Intervención experimental	8	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material negrozo granular	No	
10	5	Intervención experimental	2	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico moderada	Infiltrado linfoplasmocitario; PAN	Material negrozo granular	No	
11	5	Intervención experimental	2	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material negrozo granular	No aplica	
12	6	Intervención experimental	4	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario; macrófagos, célula gigante cuerpo	Material biorefrigente, material negrozo granular	Si	
13	6	Intervención experimental	4	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario; macrófagos, célula gigante cuerpo	Material biorefrigente	Si	
14	7	Intervención experimental	6	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material biorefrigente	No	
15	7	Intervención experimental	6	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material biorefrigente	No	
16	8	Intervención experimental	8	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material biorefrigente	Si	
17	8	Intervención experimental	8	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material biorefrigente	No	
18	9	Intervención experimental	2	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico moderada	Infiltrado linfoplasmocitario; PAN	Material negrozo granular	No	
19	9	Intervención experimental	2	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico moderada	Infiltrado linfoplasmocitario; PAN	Material negrozo granular	No	
20	10	Intervención experimental	4	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material negrozo granular	No aplica	
21	10	Intervención experimental	4	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario; macrófagos	Material negrozo granular	No	
22	11	Intervención experimental	6	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario; macrófagos	Material negrozo granular	No	
23	11	Intervención experimental	6	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material negrozo granular	No	
24	12	Intervención experimental	8	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario; macrófagos	Material negrozo granular	No	
25	12	Intervención experimental	8	Marcaplay	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico moderada	Infiltrado linfoplasmocitario; macrófagos	Material negrozo granular	No	
26	13	Control experimental	2	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico moderada	Infiltrado linfoplasmocitario; macrófagos	Gránulos de hemiderma	No	
27	14	Control experimental	4	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material negrozo granular	No aplica	
28	15	Control experimental	6	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material negrozo granular	No	
29	16	Control experimental	8	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material negrozo granular	No aplica	
30	17	Control experimental	2	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material negrozo granular	No	
31	18	Control experimental	4	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico moderada	Infiltrado linfoplasmocitario; macrófagos	Material negrozo granular	No	
32	19	Control experimental	6	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material negrozo granular	No aplica	
33	20	Control experimental	8	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material negrozo granular	No	
34	21	Control experimental	2	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material negrozo granular	No aplica	
35	22	Control experimental	4	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material negrozo granular	No aplica	
36	23	Control experimental	6	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario; macrófagos	Material negrozo granular	No	
37	24	Control experimental	8	Vidrio	Sin alteraciones	Engrasada	Ausente	Mixto estrado esquelético	Presente	Presente	Cóico leve	Infiltrado linfoplasmocitario	Material negrozo granular	No	
38	25	Control biológico	2	No aplica	Sin alteraciones	Normal	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material negrozo granular	No aplica	
39	26	Control biológico	4	No aplica	Sin alteraciones	Normal	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material negrozo granular	No aplica	
40	27	Control biológico	6	No aplica	Sin alteraciones	Normal	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material negrozo granular	No aplica	
41	28	Control biológico	8	No aplica	Sin alteraciones	Normal	Ausente	Mixto estrado esquelético	Ausente	Ausente	No aplica	No aplica	Material negrozo granular	No aplica	
42															
43															
44															
45															
46															

9.4. Formato para información inicial del biomodelo y registro de novedades

[illegible]

9.5. Aval de comité de ética animal



Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales en Experimentación

Facultad de Salud

ACTA DE AVAL A PROYECTO DEL AREA BIOMEDICA N° 001-013

Proyecto: **CAMBIOS TISULARES PRODUCIDOS POR LA IMPLANTACIÓN SUBDÉRMICA DE UN MICROCHIP RFID PASIVO RECUBIERTO CON PARYLENE C® EN RATA WISTAR**

Línea biomédica:

Sometido por: **Diego Vallejo, Carlos Mejía, Freddy Moreno y Sebastián Medina**

Código Interno: **03-013** Fecha en que fue sometido: **04** **03** **2013**

Fecha Certificación CEAS: **05** **03** **2013**

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética con animales de experimentación biomédica (CEAS) mediante Resolución No. 27-A de Marzo 10 de 1997, el cual está regido por la Ley 84, de 1989 y la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, sobre protección de Animales en experimentación y con esa garantía de cumplimiento, se da el AVAL en los aspectos Éticos para la experimentación, establece las recomendaciones y exigencias que aparecen consignadas adelante.

Este Comité certifica que:

- Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

☒ Resumen del proyecto	☐ Result de eval otros comités (si aplica)
☒ Formato solicitud de evaluación CEAS	☐ Cartas de las instituciones participantes
☐ Certificación Médico Veterinario	☐ Otro:
- El presente proyecto fue evaluado y certificado por el Comité:
Según las categorías de riesgo establecidas en el manual de experimentación con animales de la Facultad de Salud, el presente estudio tiene la siguiente Clasificación de Riesgo: **6**

A Procedimientos que no ocasionan malestar al animal o que lo minimizan.	B Procedimientos que pueden causar molestias momentáneas y que se pueden obviar con la utilización de analgésicos o anestesia.	C Animales que serán sometidos a una manipulación significativa como cirugía, perfusión de órganos y que serán sacrificados al terminar el procedimiento o durante la ejecución del mismo.
D Animales que serán sacrificados sin ningún tratamiento o manipulación de ensayo. (por ejemplo: para la obtención de tejidos, células, etc.	E	

Otro no contemplado antes: _____
- Que los procedimientos que se proponen para proteger a los animales experimentales son adecuadas y humanizados.
- La forma de obtener las licencias o permisos (si aplican), presentados por los participantes en el estudio es adecuan a norma

*Diego
Moreno
04/03/13*

Facultad de Salud

El Comité, estará en la obligación de los siguientes procedimientos de control:

5. Este proyecto será **revisado nuevamente** en ejecución, en próxima reunión del Comité, si es seleccionado; sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los animales experimentales en este estudio.
6. **Informará** oportunamente a las directivas institucionales:
 - a. Todo desacato de los investigadores a las orientaciones y solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité, ante la negligencia en el tratamiento de los animales experimentales o actos anti-éticos.
7. **Reportará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
 - a. Lesiones a sujetos experimentales por fuera de las estipuladas dentro del marco ético humanizado. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos experimentales u otras personas.
 - b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por el Comité.
8. El presente proyecto ha sido **certificado** por un periodo de **1 año** a partir de la fecha de la presente Acta. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
9. El **investigador principal** deberá informar al Comité de Ética Animal:
 - a. Cualquier cambio que se proponga introducir a este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité, excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos experimentales.
 - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos experimentales u otros seres.
 - c. Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, a la Vicedecanatura de investigaciones, secretario(a) y al presidente del Comité.
 - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos experimentales.
 - e. cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
 - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
 - g. El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación, indicando destinos de los sujetos experimentales, indicando cantidades procesadas, comportamiento de los animales experimentales. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

NOTA: EXCLUSIVAMENTE PARA SER PRESENTADO ANTE **"CONVOCATORIA INTERNA 2013"**



Firma:

Fecha: 05 03 2013

Nombre:

FERNANDO CASTRO HERRERA

Capacidad
representativa:

PRESIDENTE

Teléfono: 5185677

CERTIFICACIÓN DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE

Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales en Experimentación



Facultad de Salud

Proyecto: CAMBIOS TISULARES PRODUCIDOS POR LA IMPLANTACIÓN SUBDÉRMICA DE UN MICROCHIP RFID PASIVO RECUBIERTO CON PARYLENE C® EN RATA WISTAR

Línea biomédica:

Sometido por: Diego Vallejo, Carlos Mejía, Freddy Moreno y Sebastián Medina

Código Interno: 03-013

Fecha en que fue sometido: 04

03

2013

Por medio de la presente, certifico que la Facultad de Salud de la Universidad del Valle avala el proyecto arriba mencionado y respeta los principios, políticas y procedimientos Nacionales e Internacionales, de la Ley 84 de 1996 en defensa de los animales, en lo concerniente a los animales de experimentación y decretos reglamentarios relacionados y de la reglamentación vigente en investigación de la Universidad del Valle.

Firma:

Fecha: 05

03

2013

Nombre:

HERNÁN J. PIMENTA J.

Capacidad representativa:

VICEDECANO DE LA FACULTAD DE SALUD

Teléfono: 5185680