

01

Documentación científica



Índice

01 PROPIEDADES MECÁNICAS

- 04 Ensayos mecánicos: compresión, torsión, flexión y fatiga
- 10 Análisis mecánico mediante simulación numérica

02 PROPIEDADES SUPERFICIALES

- 26 Caracterización de la rugosidad de la superficie del implante AVINENT
- 30 Resistencia a la corrosión del implante dental AVINENT
- 34 Determinación de las propiedades hidrófilas de la superficie de los implantes AVINENT

03 PROPIEDADES BIOLÓGICAS

- 40 Evaluación de la citotoxicidad del implante dental AVINENT
- 44 Ensayos biológicos *in vitro* de los implantes dentales AVINENT



Propiedades mecánicas

Ensayos mecánicos

Compresión, torsión, flexión y fatiga

OBJETIVO

Se trata de determinar las propiedades mecánicas de los implantes dentales AVINENT. En concreto la resistencia a la fatiga de los implantes según la norma UNE-EN ISO 14801, la resistencia a la torsión y la resistencia a la compresión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del implante ensayado

Para la realización de los ensayos de fatiga, compresión y torsión se utilizaron implantes AVINENT de diámetro 3.3 x 13 mm de longitud. Se decidió utilizar el implante 3.3 x 13 mm para los ensayos mecánicos, ya que es el implante mecánicamente más débil de toda la gama, por sus reducidas dimensiones y por tener el paso de rosca más fino, lo que hace que la concentración de tensiones sea más alta.

a. Ensayos de fatiga

El ensayo de fatiga consiste en la simulación de la carga funcional del cuerpo del implante dental y de los componentes de su parte protésica bajo las peores condiciones posibles.

Para cumplir el esquema de ensayo impuesto por la norma UNE EN-ISO 14801 (fig. 1), a los implantes utilizados para los ensayos de fatiga se les montó, en su extremo libre, un miembro hemisférico de radio 2.5 mm a fin de evitar esfuerzos laterales en el ensayo. Una muestra del sistema implante-hemisferio se puede ver en la figura 2.

Para realizar los ensayos se utilizó una máquina de ensayos tracción compresión MTS Bionix 858 especialmente diseñada para trabajar sobre biomateriales que, además, tiene la posibilidad de realizar ensayos de fatiga y de torsión. Esta máquina fue equipada con una célula de carga MTS de 2.5 KN. El equipo se controló por medio de la conexión a un PC equipado con el paquete de software TestStar II®. El equipo descrito se puede observar en la figura 3.

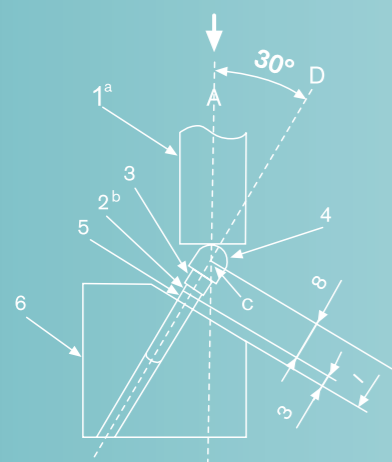


Figura 1.



Figura 2. Implante 3,3 x 13 mm de AVINENT con hemisferio acoplado.

Documento elaborado por el comité científico de AVINENT Implant System S.L. ⁽¹⁾ con la colaboración del CREB (Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica) ⁽²⁾ y el CTM (Centre Tecnològic) ⁽³⁾ ambos centros adscritos a la UPC (Universitat Politècnica de Catalunya)

⁽¹⁾ Comité científico de AVINENT Implant System S.L.: A. Cortina, C. Vendrell, E. Falcó, J. Serra

⁽²⁾ CREB: A. Mestre

⁽³⁾ CTM: J. Caro, M^a D. Riera, J. M. Prado



Figura 3. Máquina de ensayos tracción/compresión MTS Bionix 858.



Figura 4. Soporte de fijación para implantes dentales.



Figura 5. Implante con dispositivo para los ensayos de torsión.

El montaje del ensayo se puede ver en la figura 4. La aplicación de la carga se realizó mediante un punzón con la superficie plana. El ángulo de inclinación del implante con respecto al eje de aplicación de la carga fue de 30°. Los implantes quedaban sujetos a una distancia de 3 mm del ápice desde el nivel del hueso nominal, que en este caso es la superficie tratada del implante. La distancia llamada «l» en el diagrama de la figura 1, desde el centro del hemisferio al plano de sujeción, fue de 11 mm.

Tanto el soporte del implante como el punzón fueron fabricados en acero, con un módulo de elasticidad de 200 GPa. El implante se fijó a la base del soporte mediante una placa de apriete.

El miembro de carga hemisférico fabricado en Ti grado médico fue fijado al implante mediante un tornillo del mismo material, el cual será el que se comercializará con los implantes.

La carga aplicada en los ensayos fue sinusoidal y variaba entre una carga máxima establecida y el 10% de la misma. La frecuencia de todos los ensayos fue de 15 Hz.

Los ensayos de fatiga se realizaron en condiciones ambientales a una temperatura constante de 24° C.

b. Ensayos de torsión

Para realizar los ensayos de torsión se atornilló al extremo libre de los implantes dentales un transportador (fig. 5) a fin de determinar el par necesario para coronar el hexágono del implante.

Ensayos mecánicos

Compresión, torsión, flexión y fatiga



Figura 6. Torquímetro Tohnichi.

c. Ensayos de compresión

Los ensayos de compresión se realizaron en la máquina Bionix 858 descrita en el apartado a). En este caso se utilizaron dos superficies planas paralelas como mordazas para el ensayo. Se comprimió el implante longitudinalmente hasta la rotura del mismo.

RESULTADOS

Ensayos de fatiga

Inicialmente se determinó la resistencia máxima de los implantes realizando un ensayo estático de flexión a 30° hasta la rotura del implante. La velocidad de avance del pistón fue de 1 mm/min. Se realizaron seis ensayos y posteriormente se calculó la media de la resistencia de todos los ensayos. Los resultados de resistencia máxima de los implantes se muestran en la tabla 1.

Los ensayos de fatiga se realizaron aplicando una carga de flexión máxima, calculada en porcentaje respecto de la carga máxima soportada a flexión y una carga mínima del 10% como estipula la norma UNE-EN ISO 14801.

Tabla 1. Resultados de los ensayos de flexión a 30°.

Ensayo	1	2	3	4	5	6	Medida
Resistencia a fractura	1011 N	1049 N	1009 N	986 N	947 N	1023 N	1004 ± 34 N



Figura 7. Curva de fatiga resultante.

Así se realizaron un ensayo a 80% de la carga máxima a flexión, dos ensayos al 65%, dos al 50%, tres al 35%, dos al 20% y tres ensayos al 12% de la carga máxima a flexión.

La gráfica de la figura 7 muestra de manera más clara la tendencia de los resultados de fatiga. La grafica representa la fuerza máxima aplicada en cada ensayo respecto al número de ciclos soportado por el implante.

El momento de curvatura nominal para la máxima duración de la carga se puede calcular mediante la fórmula:

$$M = 0.5 \times F \times l$$

Siendo F la carga aplicada a máxima duración, en este caso 120 N, y «l» la distancia del plano de sujeción al centro de la carga, en este caso 11 mm.

Por lo tanto el momento de máxima curvatura es igual a:

$$M = 0.5 \times F \times l = 6.6 \text{ N} \cdot \text{cm}$$

En referencia a la localización de la fractura, todos los implantes fracturados, es decir, todos los implantes ensayados a más de 120 N de carga máxima, rompieron por la zona próxima al plano de sujeción

Ensayos de torsión

Se ensayaron seis implantes a torsión. El ensayo consistió en incrementar el torque aplicado progresivamente hasta la coronación del hexágono del implante.

En la tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos en los ensayos de torsión.

Tabla 2. Resultados de resistencia a la torsión de los implantes.

Ensayo	1	2	3	4	5	6	Medida
Resistencia a la coronación	1.6 Nm	1.6 Nm	1.8 Nm	1.4 Nm	1.8 Nm	1.6 Nm	1.6 ± 0.2 Nm

Ensayos mecánicos

Compresión, torsión, flexión y fatiga

Ensayos de compresión

Se realizaron tres ensayos de compresión para determinar la resistencia máxima de los implantes. Las figuras 8, 9 y 10 muestran las gráficas obtenidas en dichos ensayos. Se puede observar que la resistencia máxima del implante se produce justo antes de la rotura. La tabla 3 muestra los resultados de resistencia a la fractura de los implantes ensayados así como su media y desviación típica.

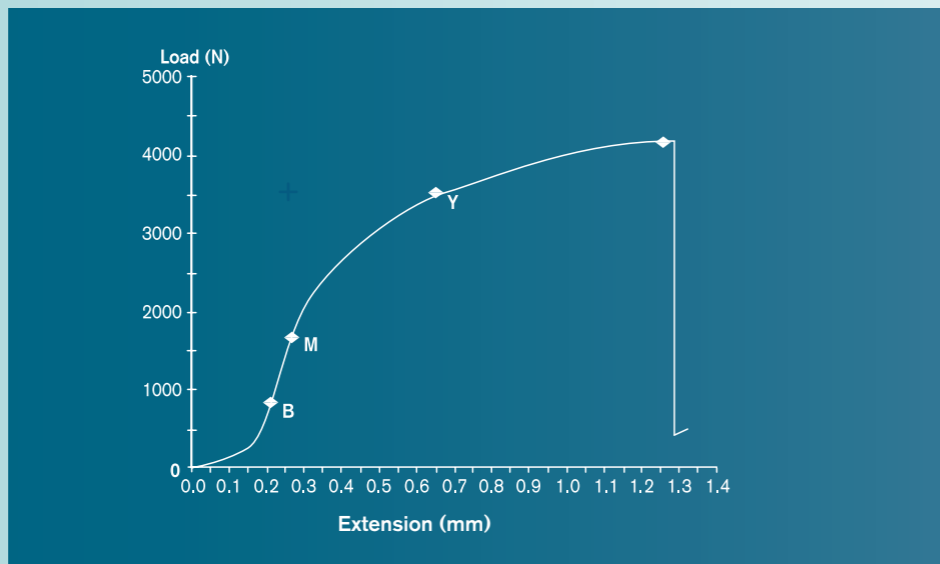


Figura 8. Gráfica de compresión de la muestra 1.

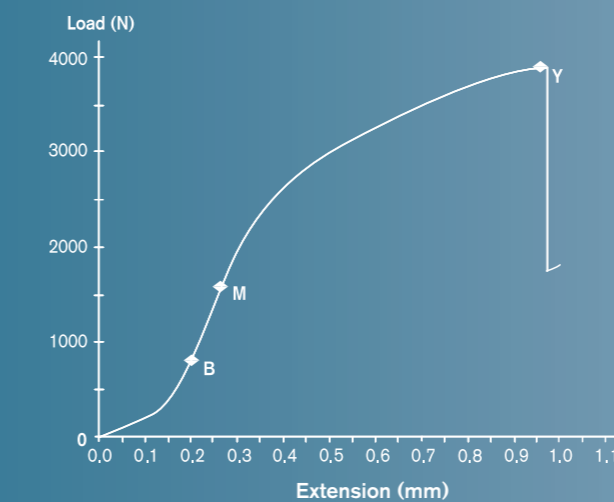


Figura 9. Gráfica de compresión de la muestra 2.

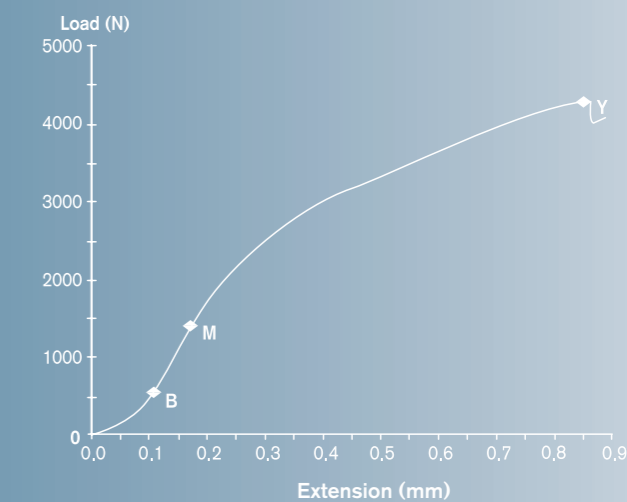


Figura 10. Gráfica de compresión de la muestra 3.

CONCLUSIONES

El implante AVINENT estudiado de 3.3 x 13 mm presentó una resistencia máxima a flexión a 30° de 1004 ± 34 N.

La carga a partir de la cual el implante AVINENT de 3.3 x 13 mm ofrecía vida infinita a fatiga es de 120 N aproximadamente, es decir, un 12% de la carga máxima resistida a flexión a 30°. El momento máximo de curvatura del implante se determinó en 6.6 N·cm.

La curva descrita por los resultados de los ensayos a fatiga muestra un comportamiento normal para componentes metálicos.

La resistencia a torsión de los implantes antes de la coronación del hexágono del implante es de 1.6 ± 0.2 N·m.

La resistencia a compresión longitudinal de los implantes AVINENT de 3.3 x 13 mm es de 4112 ± 197 N.

Tabla 3. Resultados de los ensayos de compresión.

Ensayo	1	2	3	Medida
Resistencia a la fractura	4169 N	3893 N	4275 N	4112 ± 197 N

Análisis mecánico Mediante simulación numérica

El análisis mecánico mediante simulación numérica, o método de los elementos finitos, es una herramienta de gran valor a la hora de evaluar respuestas biomecánicas ante diversas condiciones de carga.

En AVINENT hemos llevado a cabo ensayos sobre nuestros implantes dentales, evaluando su comportamiento una vez colocados y su evolución bajo cargas masticatorias. Estos estudios nos han ayudado a desarrollar el apropiado diseño de nuestros implantes dentales y aditamentos, alcanzando unas tolerancias dimensionales mínimas y teniendo en cuenta las tensiones implante-hueso para una mejor osteointegración.

OBJETIVO

El objetivo básico de este trabajo ha sido el análisis, mediante métodos numéricos, del proceso de colocación de un implante y la evolución en el tiempo de su comportamiento bajo las cargas masticatorias.

Se ha definido un modelo tridimensional, complejo, para representar los aspectos fundamentales del sistema a analizar y se han evaluado las influencias del tipo de carga, de la calidad del hueso y el nivel de osteointegración en la distribución de las tensiones y las deformaciones en el conjunto hueso-implante. La osteointegración se ha tenido en cuenta de una manera sencilla, definiendo unas regiones de transición entre el implante y los huesos cortical y trabecular, a los que se han asignado propiedades distintas para representar diferentes estadios del proceso.

MODELO GEOMÉTRICO

La anatomía de la mandíbula y la calidad del hueso varían de paciente a paciente; está claro, pues, que el modelo numérico ideal debería basarse en la geometría y la distribución ósea (espesor del hueso cortical y densidad del hueso trabecular) de cada individuo. La metodología a seguir sería analizar, mediante tomografía, la mandíbula a tratar. Las imágenes obtenidas se traducirían a un programa de CAD con el que se generaría un modelo geométrico, tridimensional, representativo de la mandíbula real y al que se incorporaría el sistema de implante en estudio. En este caso, no obstante, el análisis del implante a lo largo de las diferentes etapas (colocación, osteointegración y comportamiento en

servicio) se ha llevado a cabo en un entorno que se ha supuesto representativo de un adulto sano. Se ha obtenido la información tridimensional de una mandíbula real (ver fig. 1, A), y se ha elegido una región de dicha mandíbula sobre la que se lleva a cabo la implantación de la prótesis (ver fig. 1, B y C), de manera que el modelo geométrico completo es el representado en la fig. 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

El comportamiento mecánico asociado a todos los elementos del aquí denominado *conjunto implante* corresponde al de un material metálico convencional, con elasticidad lineal, isotropa, con módulo de Young igual a 115000 MPa y relación de Poisson 0.28, y comportamiento perfectamente plástico, con límite elástico igual a 380 MPa.

La compleja arquitectura del hueso cortical no permite, por el momento, un tratamiento micromecánico sencillo. En este trabajo, su comportamiento mecánico se simula mediante un modelo de elasticidad lineal anisotrópica. En cuanto al comportamiento plástico, se ha supuesto isotropía en la cedencia y en el endurecimiento por deformación, con límite elástico igual a 120 MPa y resistencia máxima de 133 MPa.

La respuesta mecánica del hueso trabecular depende de su densidad; ésta, a su vez, varía con la magnitud de la carga aplicada, y la orientación de las trabéculas, con la dirección de dicha carga. En el presente trabajo, se han asignado al módulo elástico valores comprendidos entre 3000 y 600 MPa. La relación de Poisson en materiales celulares depende sólo de la geometría de la célula, y no se observa dependencia de la densidad relativa; el valor habitualmente asignado a este parámetro es de 1/3.

También el comportamiento plástico del hueso trabecular está siendo objeto de numerosos estudios, que relacionan densidad y resistencia. No obstante, no se dispone de datos suficientes para implementar un modelo de comportamiento inelástico específico para este material. Aquí, se ha supuesto un comportamiento perfectamente plástico con un límite elástico de 5 a 10 MPa.

Documento elaborado por el **comité científico de AVINENT Implant System S.L.** ⁽¹⁾ con la colaboración del **CREB** (Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica) ⁽²⁾ y el **CTM** (Centre Tecnològic) ⁽³⁾

⁽¹⁾ **Comité científico de AVINENT Implant System S.L.:** A. Cortina, C. Vendrell, E. Falcó, J. Serra

⁽²⁾ **CREB:** A. Mestre

⁽³⁾ **CTM:** J. Caro, M^a D. Riera, J. M. Prado

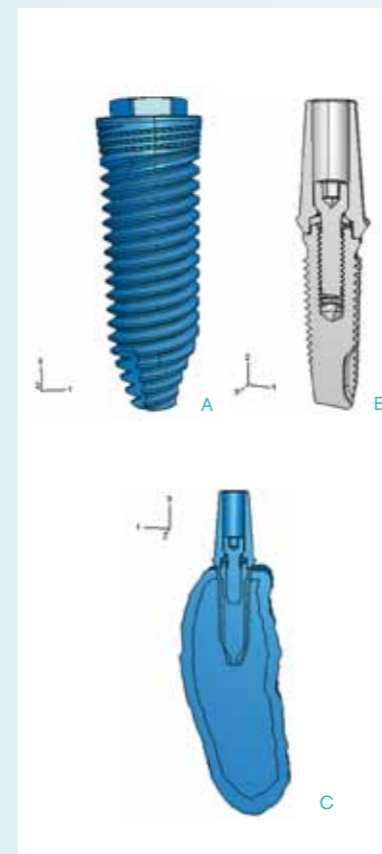


Figura 2. (A) Geometría del implante; (B) Mitad del conjunto metálico implantado; (C) Muestra, además, el hueso, en el que, tal como puede observarse en esta figura, se ha diferenciado la región cortical de la trabecular. Otro aspecto a destacar es la simplificación de la geometría en la región del contacto entre tornillo e implante, imprescindible para resolver un problema tan complejo desde el punto de vista geométrico.

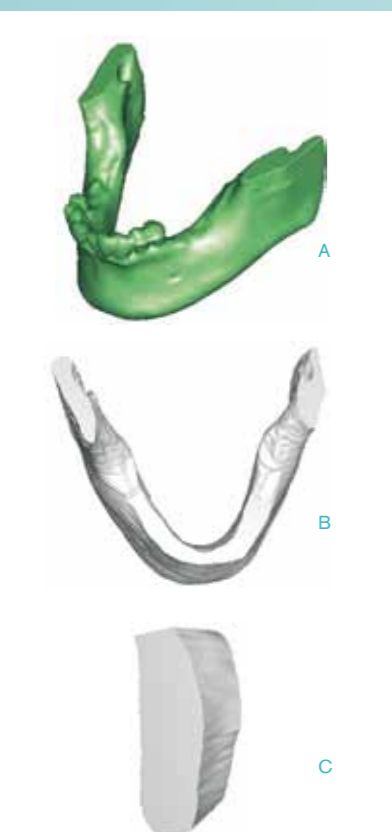
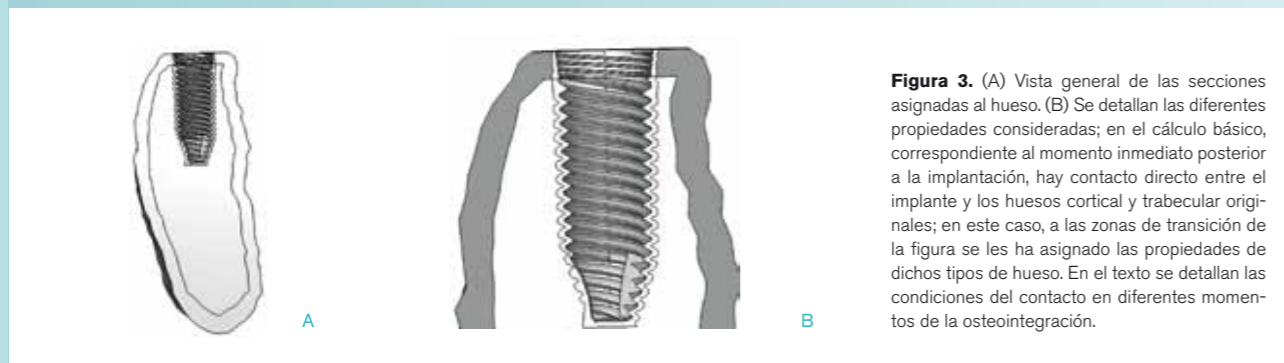


Figura 1. (A) Imagen de la mandíbula supuesta en este trabajo, obtenida con un programa de tratamiento de imágenes de scanner. (B) Geometría de la mandíbula desde el programa de cálculo numérico empleado en este trabajo. Se indica en ella la región de implantación. (C) Parte del hueso que se simula en este trabajo y al que se incorpora el conjunto implante.

Análisis mecánico

Mediante simulación numérica



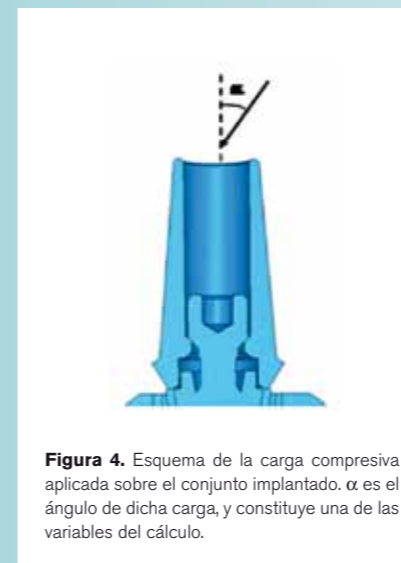
El modelo básico supone el estado óseo de la mandíbula en el momento de la implantación: capa cortical y hueso trabecular, con las características geométricas y mecánicas anteriormente definidas. Sin embargo, uno de los objetivos de la simulación ha sido el estudio del efecto que el material fruto de la osteointegración tiene en la transmisión de tensiones y su distribución en el conjunto implante-hueso. Para ello se han considerado tres casos que corresponderían a otros tantos estadios del proceso de osteointegración. En la fig. 3 se representa esquemáticamente la asignación de secciones con propiedades dependientes del tiempo tras la implantación.

Tres diferentes pares de valores del módulo de Young se han asignado a las regiones de transición entre el implante y los huesos cortical y trabecular, en los tres casos detallados a continuación.

En los tres casos se ha supuesto que las zonas de transición no han desarrollado, todavía, una estructura y, por lo tanto, un comportamiento anisotrópicos.

Tabla 1. Constantes elásticas para los tres estadios de la osteointegración supuestos.

condiciones	MÓDULO DE YOUNG (MPa) TRANSICIÓN	
	implante hueso cortical	implante hueso trabecular
caso 1	500	500
caso 2	1500	1500
caso 3	5000	1500



CÁLCULOS

Se han llevado a cabo los siguientes cálculos:

a. Cálculo básico

Consistente en la aplicación de una carga de 100 N aplicada perpendicularmente a la superficie superior del pilar. Contacto implante-hueso sin osteointegración. Corresponde a la situación tras implantación del conjunto.

b. Efecto de la inclinación de las cargas

Mediante tres cálculos, variando el ángulo α definido en la fig. 4, al que se han asignado los valores 10, 20 y 30° (b.1, b.2 y b.3, respectivamente).

c. Efecto de la osteointegración

Para un valor de α igual a 30°, se han llevado a cabo tres cálculos para los casos 1, 2 y 3 (definidos en la tabla I), que incorporan la variación de propiedades de la región de contacto implante-hueso trabecular y contacto implante-hueso cortical con el proceso de osteointegración (c.1, c.2 y c.3).

d. Efecto de la calidad del hueso

Comparando los resultados para dos espesores de hueso cortical: el básico, 1.47 mm, y 0.7 mm (d.1, d.2).

En todos los casos, el análisis se ha considerado estático. Los cálculos se han realizado con el programa de cálculo mediante el método de los elementos finitos ABAQUS 6.5.1 (HKS, Inc., 2005).

Análisis mecánico

Mediante simulación numérica

RESULTADOS

Los resultados que aquí se presentan corresponden a las distribuciones del desplazamiento del conjunto y de la tensión equivalente desarrollada en cada caso. En todas las figuras, los desplazamientos se indican en milímetros (mm) y las tensiones, en mega-Pascales (MPa).

a. Cálculo básico - Desplazamientos

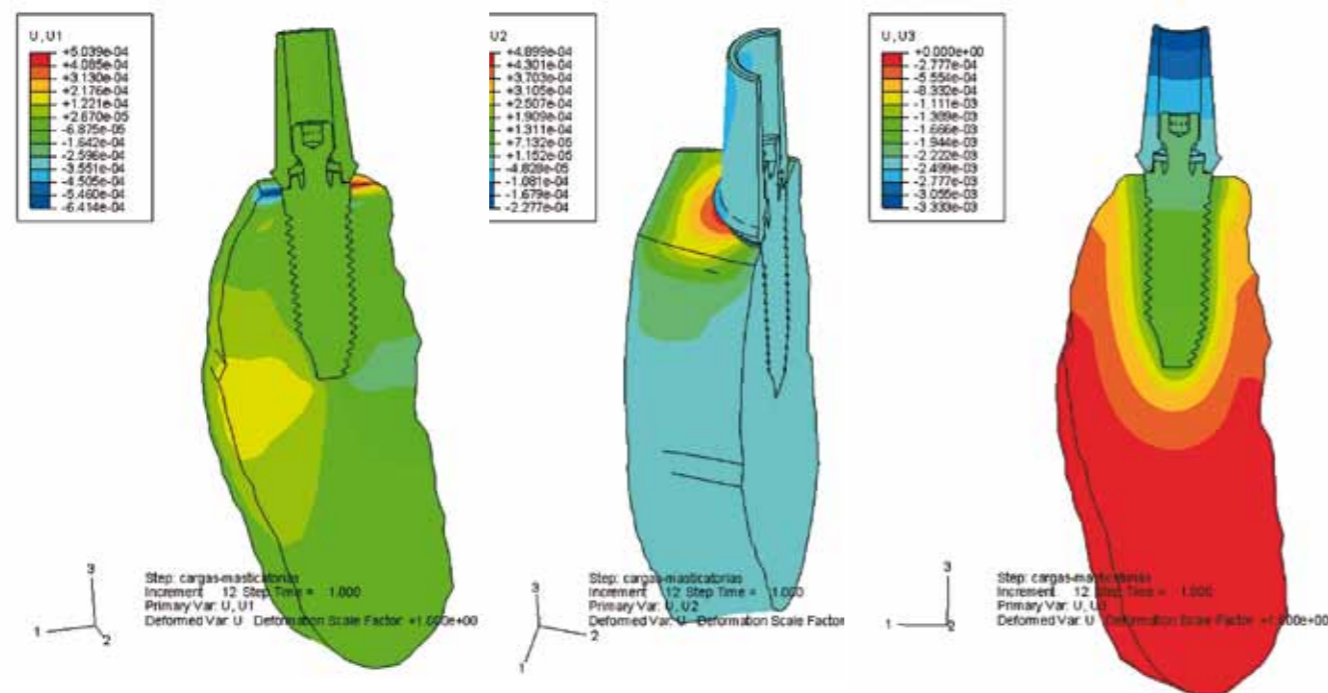


Figura 5a. Distribuciones de los desplazamientos (en milímetros) bajo carga en las tres direcciones para el conjunto analizado. Cálculo básico. Inclinación de la carga, $\alpha = 0^\circ$.

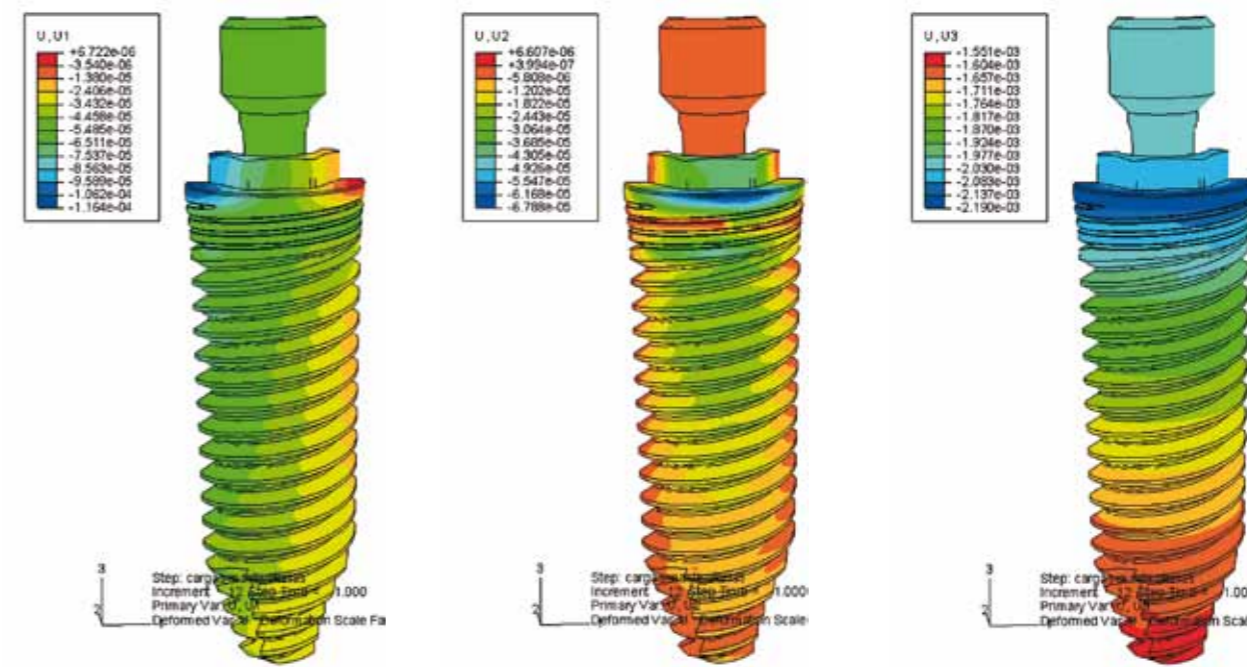


Figura 5b. Distribuciones de los desplazamientos (en milímetros) bajo carga en las tres direcciones para el conjunto implante-tornillo. Cálculo básico. Inclinación de la carga, $\alpha = 0^\circ$.

Análisis mecánico

Mediante simulación numérica

b. Efecto de la inclinación de la carga en la distribución de los desplazamientos

El desplazamiento lateral (U1) inducido en el hueso aumenta con el ángulo de inclinación de la carga.

c. Efecto del nivel de osteointegración en la distribución de los desplazamientos

Para un valor del ángulo de aplicación de la carga de 30° y las propiedades definidas en la tabla 1 para tres niveles de osteointegración, los resultados obtenidos para el desplazamiento bajo carga se comparan en la fig. 7.

A medida que aumenta la rigidez de la región osteointegrada, el desplazamiento en dirección U1 bajo la misma carga, disminuye.

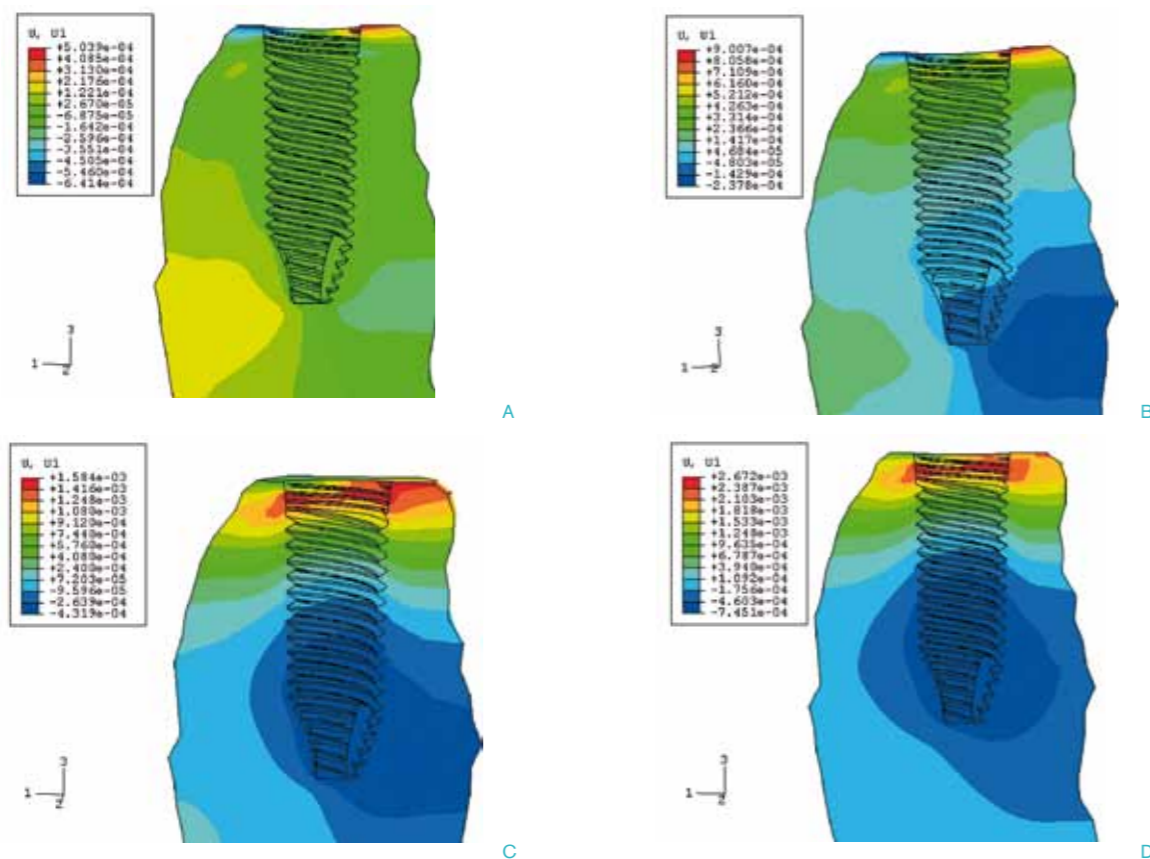


Figura 6. Distribución del desplazamiento U1 en el hueso para las distintas inclinaciones de la carga estudiadas. (A) 0°; (B) 10°; (C) 20° y (D) 30°.

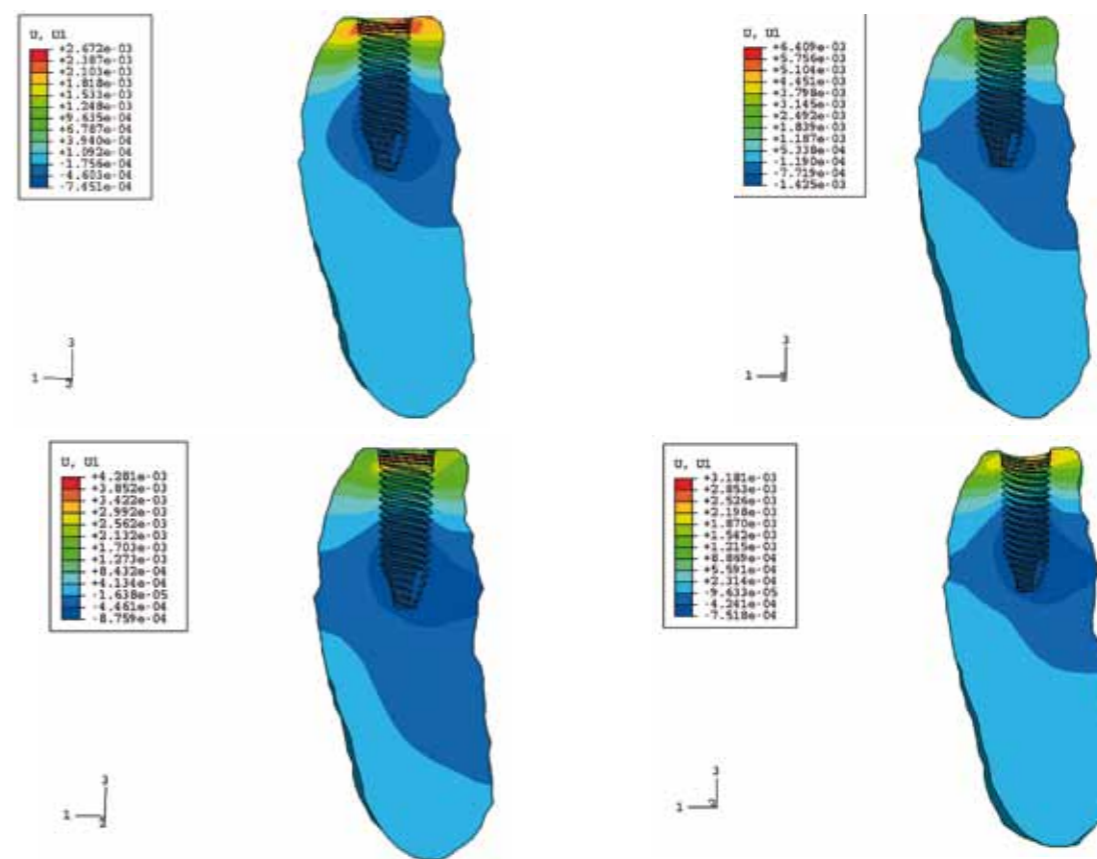


Figura 7. Distribución del desplazamiento en dirección 1 en el hueso trabecular para: arriba, de izquierda a derecha, casos b.3 y c.1 (caso general con $\alpha=30^\circ$, e inicio de la osteointegración, respectivamente) y, abajo, también de izquierda a derecha, los casos 2 y 3 (c.2 y c.3, etapas intermedia y final de las fases de osteointegración consideradas).

Análisis mecánico

Mediante simulación numérica

d. Efecto de la calidad del hueso en la distribución de los desplazamientos

Al disminuir el espesor del hueso cortical (más rígido que el trabecular), el desplazamiento en dirección U1 por efecto de la carga aplicada, aumenta, tal como se desprende de la observación de la fig. 8, que compara los resultados para los casos b.3 (caso peor de carga, $\alpha = 30^\circ$), con espesor de cortical igual a 1.47 mm, y el caso d.2 (espesor de hueso cortical igual a 0.7 mm).

a. Cálculo básico - Tensión equivalente

La distribución de la tensión equivalente para el conjunto y los distintos elementos del modelo, se presenta en las figuras 9 a 12.

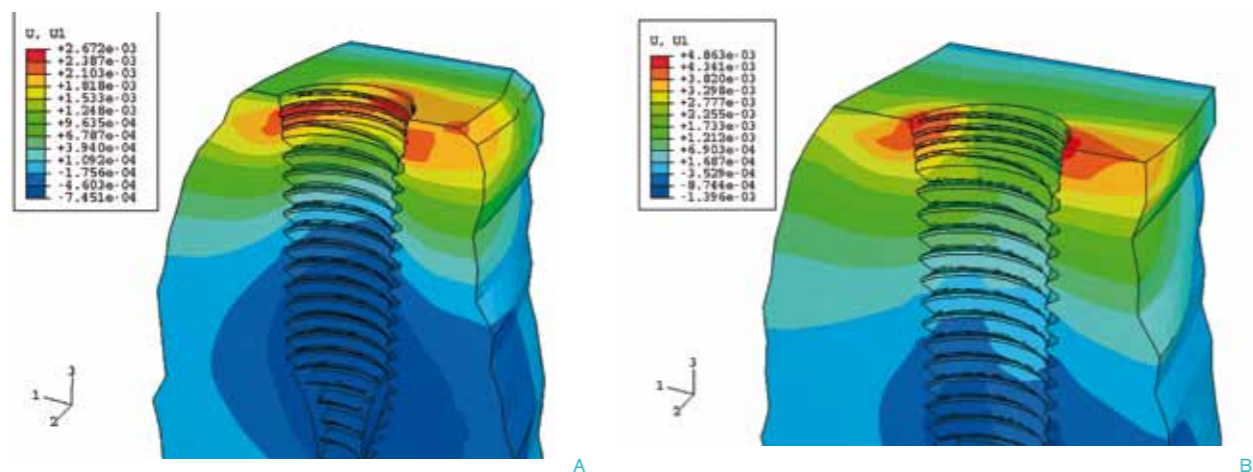


Figura 8. Distribución del desplazamiento U1 en el hueso para dos espesores diferentes de hueso cortical. Arriba, (A) 1.47 mm (caso b.3); (B) 0.7 mm. En ambos casos, la carga se ha aplicado con un ángulo de 30° (caso d.2).

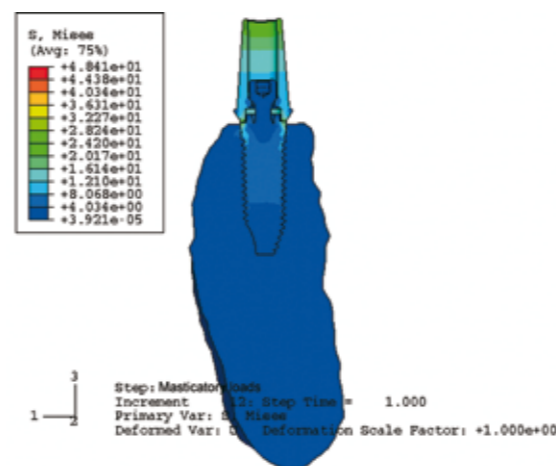


Figura 9. Distribución de la tensión de von Mises (en MPa) bajo carga en el conjunto analizado.

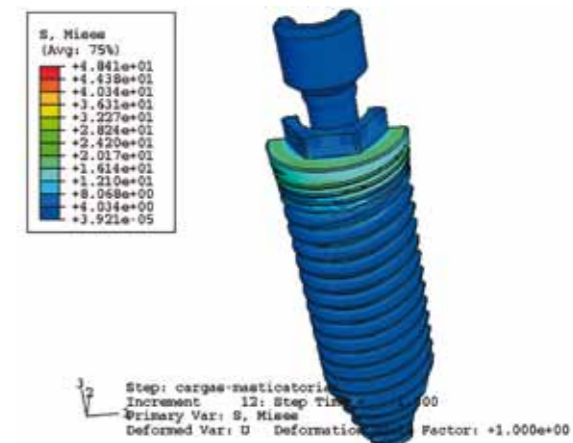


Figura 10. Distribución de la tensión de von Mises (en MPa) bajo carga en el implante.

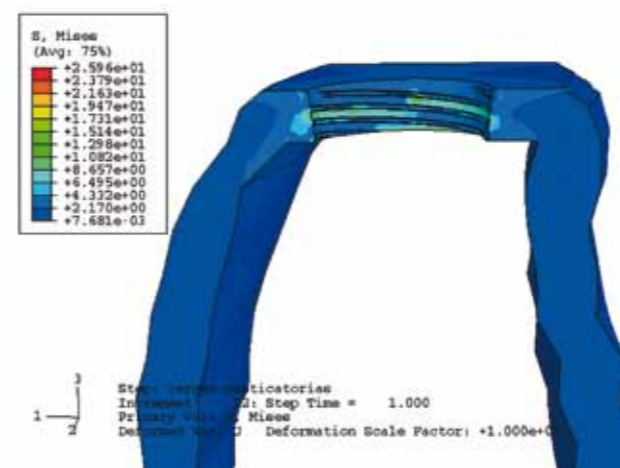


Figura 11. Distribución de la tensión de von Mises (en MPa) en el hueso cortical bajo carga.

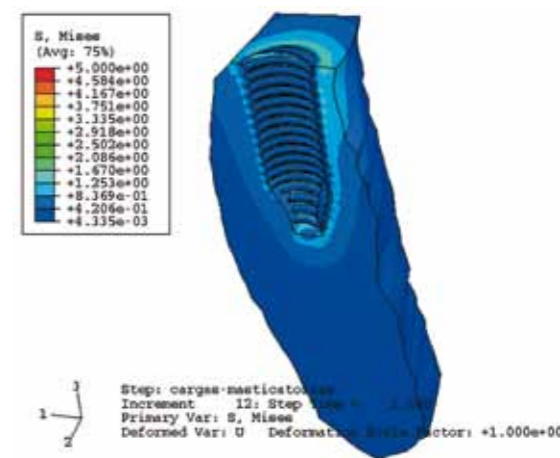


Figura 12. Distribución de la tensión de von Mises (en MPa) en el hueso trabecular bajo carga.

Análisis mecánico

Mediante simulación numérica

b. Efecto de la inclinación de la carga en la distribución de la tensión equivalente

Las distribuciones de la tensión equivalente (Mises) en el implante, se comparan para las distintas inclinaciones, en la fig. 13. También la tensión equivalente aumenta con el ángulo de aplicación de la fuerza masticatoria considerada. Como se deduce de los resultados de la misma fig. 13, las tensiones en el implante pueden ser considerables, situándose el máximo valor en la región superior, en el contacto con el hueso cortical.

c. Efecto del nivel de osteointegración en la distribución de tensiones

En la fig. 14 se comparan las distribuciones de la tensión equivalente para los cuatro conjuntos de materiales supuestos.

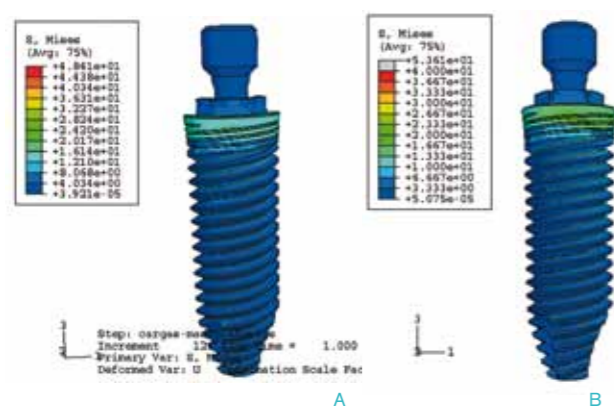


Figura 13a. Distribución de la tensión equivalente en el implante para las distintas inclinaciones de la carga estudiadas. En este apartado de la figura, (A) 0° y (B) 10°.

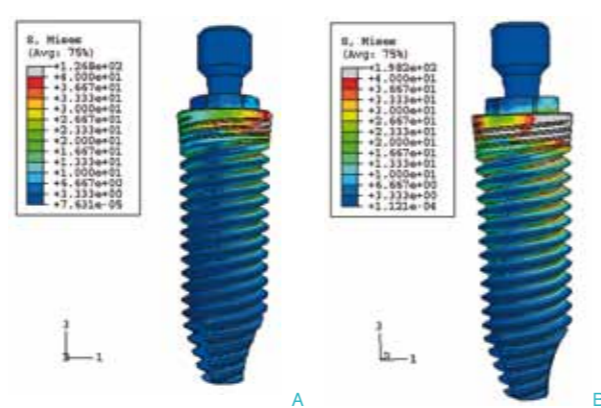


Figura 13b. Distribución de la tensión equivalente en el implante para las distintas inclinaciones de la carga estudiadas: (A) 20°, y (B) 30°.

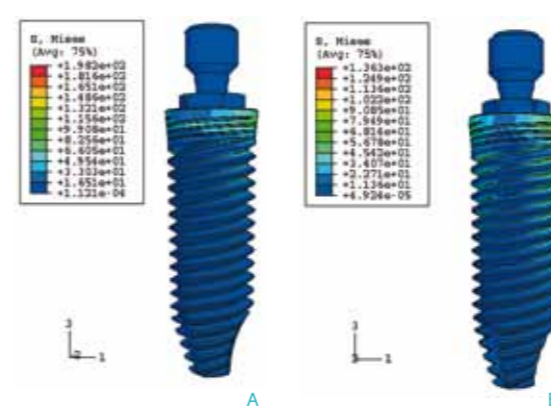


Figura 14a. Distribución de la tensión equivalente para el caso b.3 (A) y el caso 1 (etapa muy inicial en el proceso de osteointegración).

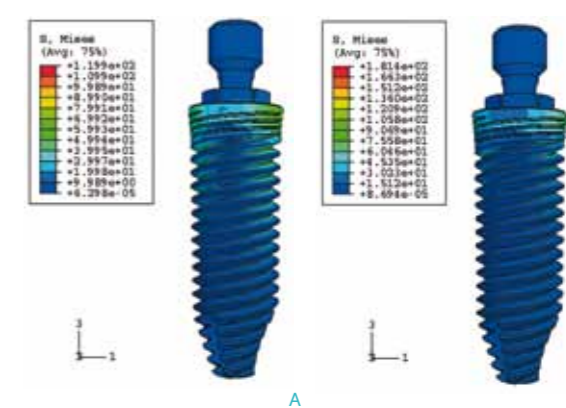


Figura 14b. Distribución de la tensión equivalente para los casos 2 (A) y 3 (etapas intermedia y final de las consideradas) en el implante.

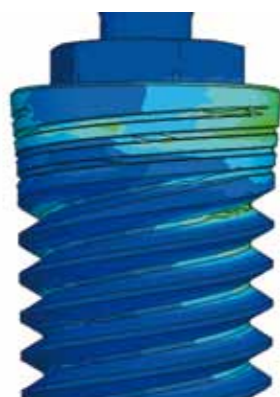
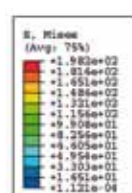
Análisis mecánico

Mediante simulación numérica

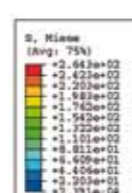
d. Efecto de la calidad del hueso en la distribución de tensión equivalente

En la fig. 15 pueden compararse los estados tensionales en el implante para las dos calidades de hueso consideradas (d.1 y d.2).

Como puede observarse en esta figura, al disminuir la cantidad de hueso cortical la tensión equivalente en la región superior del implante es mayor.



A



B

Figura 15a. Distribución de la tensión equivalente en el implante para los dos espesores de hueso cortical: 1.47 mm (A) y 0.7 mm.

Figura 15b. Distribución de la tensión equivalente para los casos 2 (A) y 3 (etapas intermedia y final de las consideradas) en el implante.

CONCLUSIONES

El método de los elementos finitos es una herramienta muy interesante para la evaluación de la respuesta biomecánica de implantes dentales ante muy diversas condiciones de carga. En un tiempo relativamente corto pueden analizarse los efectos de la calidad del hueso, de la morfología anatómica, la conveniencia de diversos tipos de implantes en un individuo determinado, etc.

No obstante, la aplicación de esta técnica en este caso tiene, todavía, serias limitaciones que provienen, básicamente, de la dificultad de comparar sus resultados con datos reales y del limitado conocimiento de algunos de los fenómenos que gobiernan los procesos de implantación y osteointegración.

Las propiedades mecánicas del hueso cortical, muy anisótropico, son variables en las distintas zonas de la misma mandíbula; aunque se han publicado algunos datos al respecto, es difícil incorporar al modelo numérico esta variabilidad. Se sabe, además, que la densidad y, por lo tanto, las propiedades del hueso trabecular varían con la carga aplicada, y este aspecto no se incorpora por el momento a las simulaciones numéricas.

La práctica quirúrgica de implantación, con o sin interferencia mecánica, puede modificar notablemente el estado tensional del conjunto implante-hueso y, por lo tanto, afectar a la osteointegración subsiguiente. En este trabajo, se han analizado y comparado distintas situaciones.

Quizás el punto más débil de la simulación en implantología dental, desde el punto de vista de las propiedades de los materiales, sea la dificultad de implementar el fenómeno de osteointegración. Para tener en cuenta este fenómeno, aquí se ha definido una zona de transición entre el implante y los huesos trabecular y cortical, a la que se han asignado propiedades que varían con la fase en análisis. Esta estrategia permite, al menos, evaluar el progresivo cambio del estado de deformación del sistema implante-hueso tras la implantación.

El sistema es, además de complejo, delicado. La misma fabricación del tornillo de ajuste del implante, mediante procesos industriales, requiere inevitablemente unas tolerancias dimensionales. En este trabajo se ha comparado el estado mecánico inducido por las cargas masticatorias en dos supuestos: a) aquel en el que las roscas interna del implante y externa del tornillo ajustan perfectamente, y b) teniendo en cuenta el caso peor, aquel en el que las piezas están cumpliendo la normativa dimensional, pero las roscas no encajan perfectamente.

A modo de conclusión general, las técnicas de simulación numérica pueden resultar una gran ayuda al diseño de prótesis dentales, sin perder de vista una serie de aspectos muy importantes que son, todavía, de difícil incorporación al análisis. No obstante, y al igual que sucede en otras disciplinas de la ingeniería, la simulación permite conocer, al menos cualitativamente, la distribución de esfuerzos y deformaciones en los distintos elementos que constituyen la región implantada.



Propiedades superficiales

Caracterización de la rugosidad de la superficie del implante AVINENT

Documento elaborado por el **comité científico de AVINENT Implant System S.L.** ⁽¹⁾ con la colaboración del **CREB** (Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica) ⁽²⁾ y el **CTM** (Centre Tecnològic) ⁽³⁾

⁽¹⁾ **Comité científico de AVINENT Implant System S.L.:** A. Cortina, C. Vendrell, E. Falcó, J. Serra

⁽²⁾ **CREB:** A. Mestre

⁽³⁾ **CTM:** J. Caro, M^a D. Riera, J. M. Prado

OBJETIVO

Observación de los implantes AVINENT, cuya superficie se obtiene gracias a la combinación de un proceso de *shot blasting* seguido de un proceso de tratamiento electroquímico. El proceso de *shot blasting* (impacto de partícula) dota a la superficie del implante de una rugosidad estructural óptima. Posteriormente, el proceso electroquímico (anodizado) modifica la microtopografía superficial, provocando una porosidad en el óxido de titanio y permitiendo, al mismo tiempo, incorporar elementos químicos (Ca y P) que confieren a la superficie final unas propiedades totalmente biomiméticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

a. Preparación de las muestras

Se prepararon las muestras según lo que corresponde al tratamiento superficial AVINENT y se observaron en el microscopio electrónico de barrido (fig. 1).



Figura 1.

b. Medida de la rugosidad

La rugosidad de cada una de las muestras se determinó mediante el microscopio interferométrico WYCO NT 1100 de la casa Veeco, que ofrece una resolución vertical de < 1 nm y una resolución horizontal de 400 nm, y que permite obtener imágenes tridimensionales de la superficies de las muestras. Las técnicas interferométricas miden el patrón de interferencia de la luz que proviene de un plano de referencia (típicamente un espejo) y la luz reflejada en la superficie que se quiere estudiar. En el presente estudio la técnica que se utilizó fue la VSI (Vertical Scanning Interferometry) que utiliza la luz blanca para la detección de los cambios de intensidad de la franjas, y determinar de esta forma las diferencias en altura.

Se realizaron cuatro medidas para cada una de las superficies estudiadas. Los principales parámetros estudiados fueron:

Ra (media aritmética de las desviaciones del perfil): es la media aritmética del valor absoluto de las distancias desde la línea media al perfil R dentro de la longitud de muestra L. Esta línea media es una línea de referencia para el cálculo de los distintos parámetros, que se determina por el método de mínimos cuadrados respecto al perfil R en cada longitud de muestra. Ra se calcula en micrómetros y es el parámetro más general y comúnmente utilizado para describir la rugosidad (fig. 2).

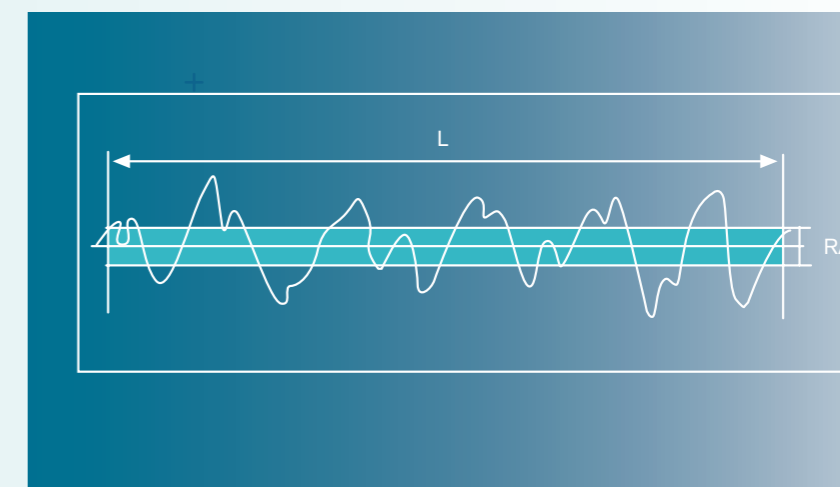


Figura 2. Representación gráfica del parámetro Ra.

Caracterización de la rugosidad de la superficie del implante AVINENT

Rq (media aritmética de las desviaciones del perfil): es el valor medio de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil respecto a la línea media, dentro la longitud de muestra L. Este parámetro es más sensible que Ra a los valores extremos debido a la operación raíz cuadrada. Rq tiene un significado estadístico, ya que es la desviación estándar de la distribución de alturas del perfil.

Rt (altura total pico-valle): es la diferencia entre la altura del pico más alto y la altura del valle más profundo. Se expresa en micrómetros.

Índice entre superficies: es la relación entre el valor del área real de una superficie y su área nominal o microscópica.

Sm: distancia media entre pico y valle

RESULTADOS

A continuación se muestran las imágenes obtenidas al microscopio electrónico de la fase de *shot blasting* con la rugosidad estructural óptima, y de la fase final del tratamiento electroquímico, donde se puede observar a gran aumento la porosidad en el óxido de titanio.

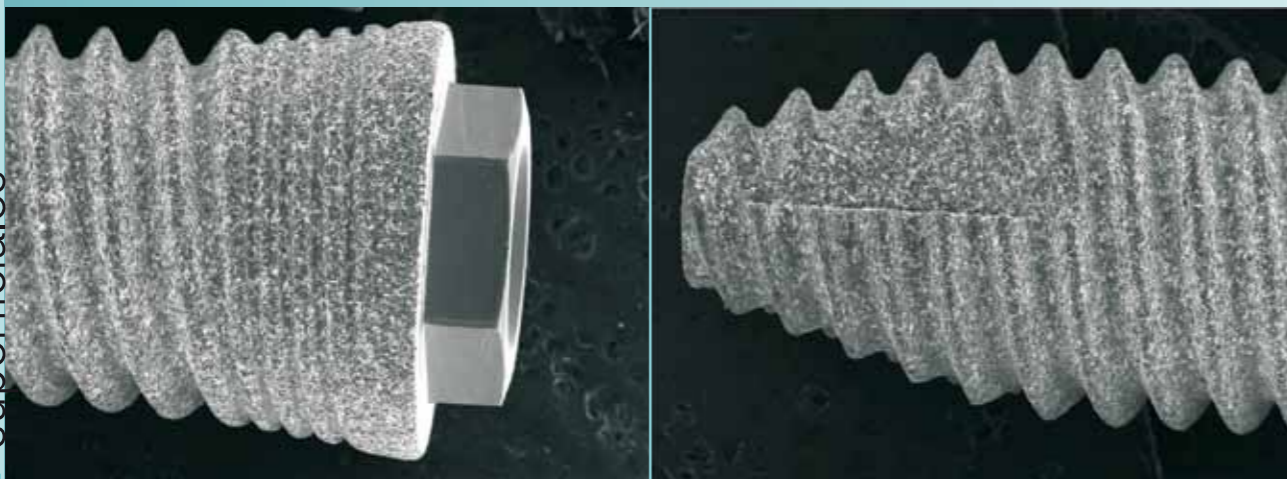


Figura 3. Implante AVINENT. Fase *shot blasting*. Aumento 17x

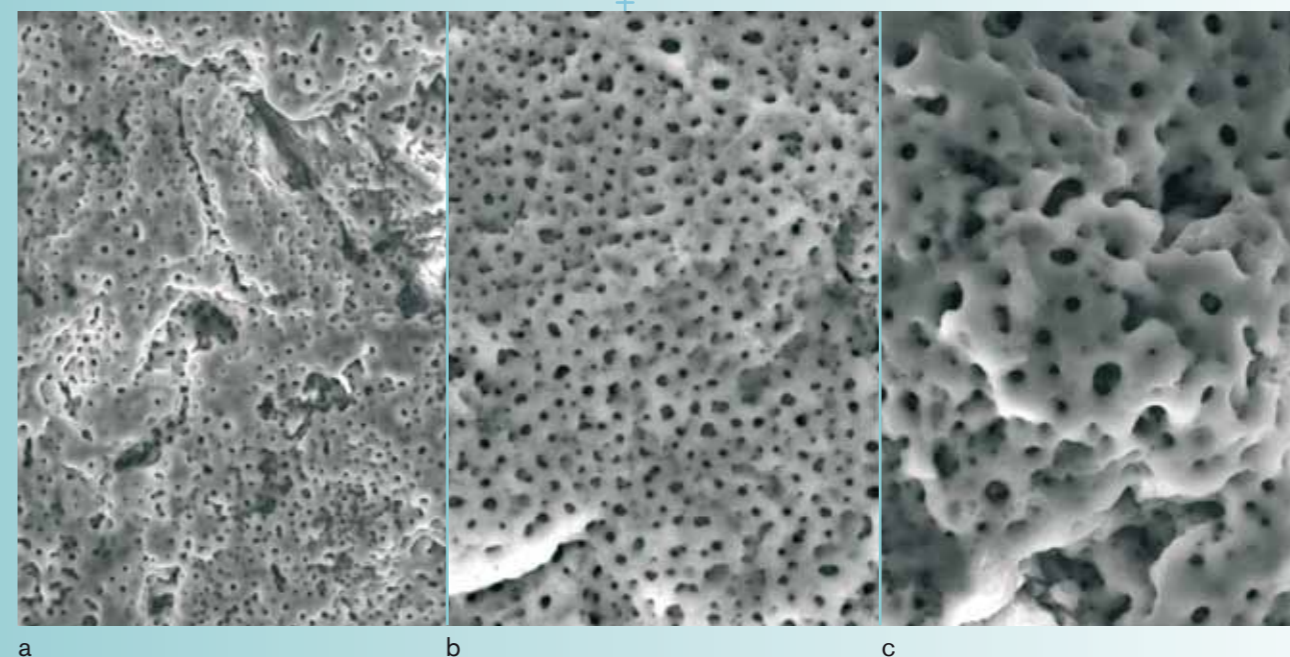


Figura 4. Implante AVINENT. Fase tratamiento electroquímico. Aumento: a) 1000x, b) 3000x, c) 5000x

CONCLUSIONES

El tratamiento superficial AVINENT aumenta considerablemente el área total del implante en un 76%. Este hecho mejora la estabilidad del implante dental, ya que hay una mayor zona de contacto entre el implante y el hueso y así se promueve una buena osteointegración.

Resistencia a la corrosión del implante dental AVINENT

Documento elaborado por el **comité científico de AVINENT Implant System S.L.** ⁽¹⁾ con la colaboración del **CREB** (Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica) ⁽²⁾ y el **CTM** (Centre Tecnològic) ⁽³⁾

⁽¹⁾ **Comité científico de AVINENT Implant System S.L.:** A. Cortina, C. Vendrell, E. Falcó, J. Serra

⁽²⁾ **CREB:** A. Mestre

⁽³⁾ **CTM:** J. Caro, M^a D. Riera, J. M. Prado

OBJETIVO

Determinar el efecto de la superficie AVINENT en la resistencia a la corrosión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos electroquímicos se realizaron sobre implantes dentales de 12 mm de longitud y 4 mm de diámetro con una área superficial de 191,1 mm².

Los ensayos realizados para determinar las propiedades electroquímicas fueron:

- **Potencial Libre (Open Circuit Potencial)**
- **Potencial cíclico**

Ambos ensayos se realizaron empleando una celda electrolítica de vidrio de 200 ml de capacidad conectada a un potenciostato modelo VOLTALAB PGZ 301, conectado a un ordenador, desde donde se controla todo el ensayo mediante el software VOLTAMASTER4. En el presente estudio se utilizó como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl y como electrodo auxiliar o contraelectrodo un electrodo de platino (fig. 1).

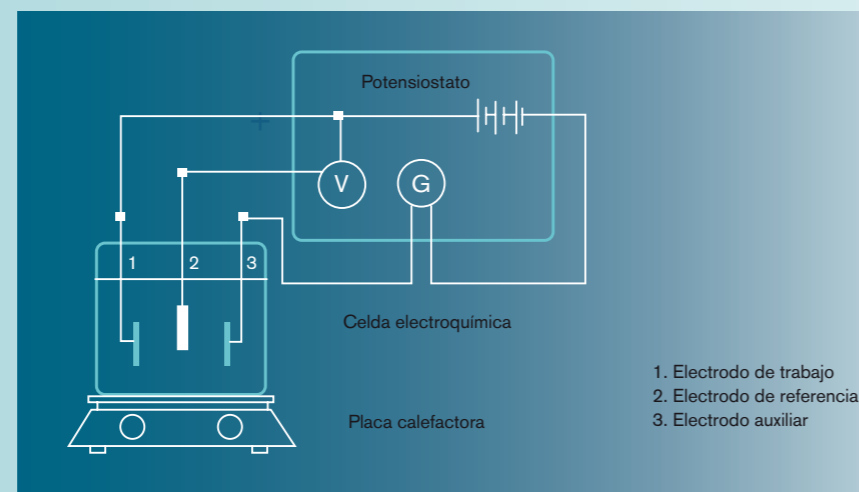


Figura 1. Esquema del montaje para la realización de los ensayos.

Los ensayos de potencial libre y voltametría cíclica se realizaron a una temperatura de 37,5° C y utilizando como electrolito Hank's balanced salt solution (Sigma) con un pH = 7.13. Este electrolito se seleccionó por ser una solución comercial con contenidos iónicos similares a los del plasma humano y ser la recomendada por las normas internacionales para este tipo de ensayos. La composición química de dicha solución se detalla en la tabla 1. Todas las lecturas de voltaje fueron referidas al electrodo estándar de Ag/AgCl. En los ensayos de potencial libre se dejó estabilizar la muestra sumergida en el electrolito durante 40 minutos, registrando la diferencia de potencial entre la muestra y electrodo de referencia. En el caso de los ensayos de potencial cíclico se aplicó una rampa de voltaje de pendiente 1 mV/s en la dirección más noble entre la muestra y el electrodo de referencia y se registró el valor de corriente que circulaba entre la muestra y el electrodo auxiliar.

En el caso de que la capa de óxido de titanio producida durante el tratamiento superficial fuera parcialmente dañada, cabía la posibilidad de que se formara un par galvánico entre la zona tratada y la no tratada. Por ese motivo también se determinaron la curvas de potencial cíclico y de potencial libre para un implante parcialmente tratado, donde se dejó sin tratar una zona cercana al ápice de 7 mm².

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (G/L)
CaCl ₂ .H ₂ O	0.18
KCl	0.4
KH ₂ PO ₄	0.06
MgO ₂ .6H ₂ O	0.08
MgSO ₂ .7H ₂ O	0.7
NaCl	8
NaHCO ₃	0.35
Na ₂ HPO ₄	0.48
D-glucosa	1

Tabla 1. Composición química *Hank's balanced salt solution*.

Resistencia a la corrosión del implante dental AVINENT

RESULTADOS

a. Potencial libre

El ensayo de potencial libre mostró que los implantes AVINENT presentaban un potencial de estabilización más positivo (282 mV Vs Ag/AgCl) que el implante sin anodizar (-21 mV Vs Ag/AgCl). Esto significa que la superficie AVINENT ennoblecía el material y por lo tanto aumenta la resistencia a la corrosión en el medio seleccionado (fig. 2).

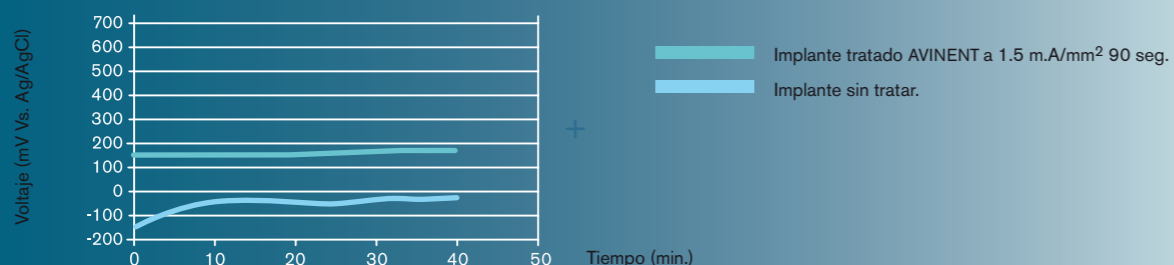


Figura 2. Curvas de potencial libre para el implante tratado y sin tratar.

b. Potencial cíclico

Las curvas de potencial cíclico reiteraron los resultados obtenidos en las curvas de potencial libre. Los implantes AVINENT mostraron una alta resistencia a la corrosión, obteniéndose densidades de corriente muy inferiores que en los implantes sin tratar. El implante AVINENT mostró una gran capacidad de repasivación, como demuestra la caída en la corriente hasta alcanzar valores nulos, al revertir el ciclo de polarización, es decir, en la rama de avance hacia potenciales menos nobles. Los picos de oxidación que presentaba el implante sin tratar se asocian a los cambios estructurales de los óxidos presentes en la superficie (fig. 3).

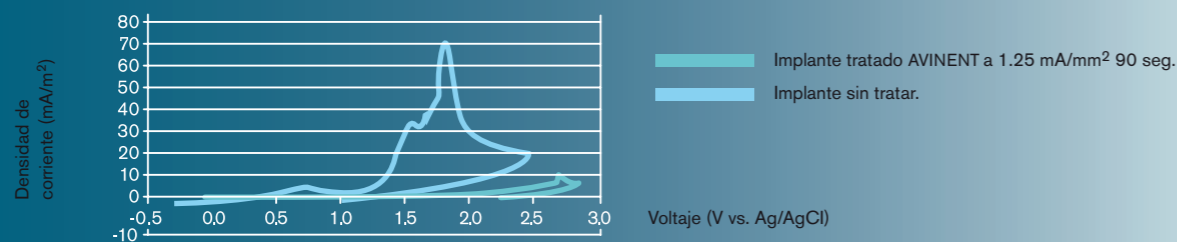


Figura 3. Curvas de potencial cíclico para el implante tratado y sin tratar.

c. Resistencia a la corrosión de un implante parcialmente tratado

El implante parcialmente tratado presentó una resistencia a la corrosión menor que el implante completamente tratado, pero que seguía siendo superior a la del implante sin tratar. El potencial libre se estabilizó alrededor de 70 mV (fig. 4) y las curvas de potencial cíclico reiteraron la capacidad de repasivación de la aleación (fig. 5).

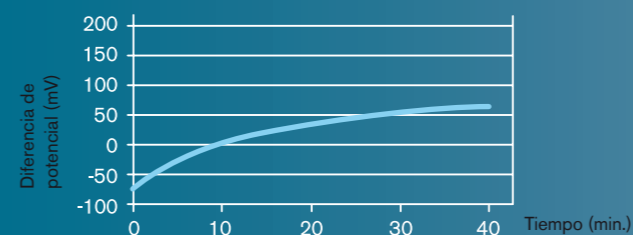


Figura 4. Curvas de potencial libre para el implante tratado y sin tratar.

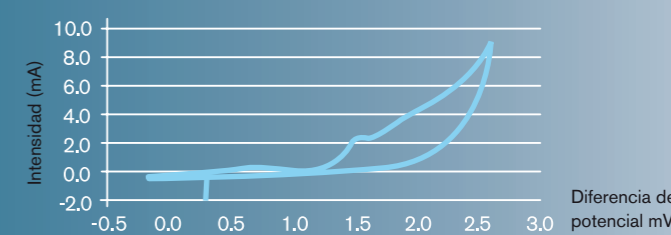


Figura 5. Curva de potencial cíclico para un implante parcialmente tratado.

CONCLUSIONES

Los ensayos realizados para evaluar la resistencia a la corrosión del implante AVINENT mostraron que la superficie mejoraba considerablemente la buena resistencia a la corrosión del implante sin tratar estabilizando la capa de óxido superficial. También se demostró que el efecto de la formación de un par galvánico entre la zona tratada y las zonas no tratadas no supone una disminución significativa de la resistencia a la corrosión, y por tanto no tendrá efecto alguno en el buen comportamiento en servicio del implante.

Por otra parte se observa que el potencial de picadura o potencial de corrosión de los implantes tratados es alrededor de los 1300 mV Vs Ag/AgCl, el cual es muy superior a los potenciales que se pueden encontrar generalmente en boca (alrededor de los 200 mV Vs ESC) [1], asegurando así la resistencia a la corrosión del implante en servicio.

REFERENCIAS

[1] Ewers G. J; Greener, E. H. *The electrochemical activity of the oral cavity. A new approach.* J. of Oral rehab., 12 (1985).

Determinación de las propiedades hidrófilas de la superficie de los implantes AVINENT

OBJETIVO

Determinar las propiedades hidrófilas de la superficie AVINENT mediante la medición del ángulo de contacto y la determinación de su energía superficial.

MATERIALES Y MÉTODOS

a. Preparación de las muestras

En el presente estudio se han empleado dos tipos de muestras: pulidas y tratadas. Ambas obtenidas a partir de discos de Ti grado médico de 10 mm de diámetro y 2 mm de espesor.

Los discos lisos se prepararon puliéndolos inicialmente con papeles de carburo de silicio y posteriormente con óxido de aluminio con un tamaño de partícula de 1 μm y 0,05 μm. Una vez pulidos los discos fueron lavados en ultrasonidos.

Los discos tratados se prepararon variando uno de los parámetros del tratamiento superficial para finalmente escoger la mejor hidrofiliía para una óptima respuesta celular.

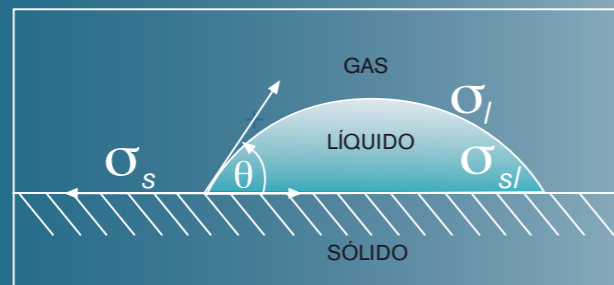


Figura 1. Equilibrio de tensiones interfaciales para una gota de líquido depositada en un sólido. Donde σ_s = energía libre del sólido, σ_{sl} = energía libre de la intercara sólido - líquido, σ_l = tensión superficial del líquido y θ = ángulo de contacto.

b. Medición del ángulo de contacto y determinación de la energía superficial

Para la medición del ángulo de contacto se utilizó el método *sessile drop*, según el cual se deposita, mediante una jeringa, un volumen de agua entre 3-6 μl, calidad mili-Q, sobre la superficie a estudiar. Una vez la gota de líquido se estabiliza, se procede a la medición del ángulo de contacto θ , como se muestra en la figura 1, con el equipo Contact Angle System OCA 15+ (Data physics, Alemania), con el software SCA20 (figura 2).



Figura 2. Equipo Contact Angle System OCA 15+.

Para el cálculo de la energía superficial de la muestra se utilizó la ecuación de Young (Ec.1)

$$\sigma_s = \sigma_{sl} + \sigma_l \cdot \cos\theta \quad [\text{Ec.1}]$$

Como valor de σ_l se ha tomado el valor de 72,75 mN/m y para la determinación de σ_{sl} se ha considerado la teoría de Neuman donde $\sigma_{sl} = f(\sigma_l, \sigma_s)$. Para ello se ha aplicado la aproximación de Berthelot, que viene definida por la siguiente ecuación (Ec.2).

$$\sigma_{sl} = \sigma_l + \sigma_s - 2 \sqrt{\sigma_l \cdot \sigma_s} \quad [\text{Ec.2}]$$

Substituyendo [Ec.2] en [Ec.1] se puede obtener:

$$\sigma_s = \frac{\sigma_l (1 + \cos\theta)^2}{4} \quad [\text{Ec. 3}]$$

RESULTADOS

La figura 3 muestra los valores del ángulo de contacto de la superficie pulida y de los diferentes ensayos de la superficie tratada.

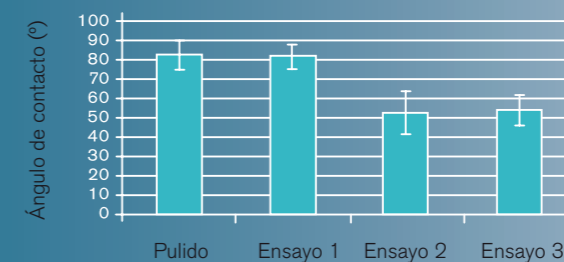


Figura 3. Tabla de valores del ángulo de contacto y ensayos.

Determinación de las propiedades hidrófilas de la superficie de los implantes AVINENT

En la tabla 1 se exponen los valores de la energía libre superficial de cada uno de los ensayos.

	$\theta(^{\circ})$	σ_s (J/m ²)
pulido	84.9	21.56
ensayo 1	84.9	21.56
ensayo 2	55.0	45.03
ensayo 3	56.0	44.22

La figura 4 muestra algunas de las imágenes capturadas durante la medición del ángulo de contacto.

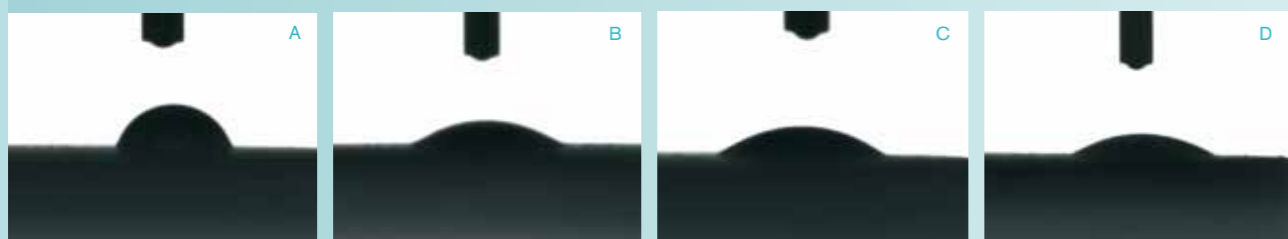


Figura 4. Imágenes capturadas durante la medición del ángulo de contacto en cada una de las superficies estudiadas: (A) pulida, (B) ensayo 1, (C) ensayo 2, (D) ensayo 3.

CONCLUSIONES

El ángulo de contacto indica la mojabilidad de una superficie y por lo tanto su hidrofiliicidad o hidrofobicidad. Los resultados indicaron que el ángulo de contacto entre el agua y las distintas superficies disminuía significativamente para los ensayos 2 y 3 en comparación con las muestras pulidas y el primer ensayo. Este aumento en la hidrofiliicidad, debido a las variaciones químicas y topográficas de la superficie AVINENT, se traduce en un aumento de la energía superficial de la superficie tratada.

Existen varios estudios donde se especifica la preferencia de utilizar superficies con una elevada energía superficial para implantes endoóseos, debido a que un aumento de la mojabilidad mejora la interacción entre el implante y el medio bio-

lógico, produciendo un incremento en la diseminación celular y en la capa celular [1, 2, 3, 4, 5 y 6]. Eriksson *et al.* realizaron ensayos *in vivo* donde relacionaron la hidrofiliicidad de un implante y su capacidad de osteointegración [7]. Por tanto la hidrofiliicidad de una superficie es uno de los factores que determina la biocompatibilidad de un biomaterial y es directamente dependiente de la energía superficial.

REFERENCIAS

- [1] Zhao, G.; Z. Schwartz; M. Wieland; F. Rupp; J. Geis-Gerstorfer; D. L. Cochran; B. D. Boyan. *High surface energy enhances cell response tot titanium substrate microstructure*. Published online 27 May 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
- [2] Schrader, M. E. *On adhesion of biological substances to low-energy solid-surfaces*. *J Colloid Interface Sci.* 1982, 20:773-784.
- [3] Schakenraad, J. M.; H. J. Busscher; C. R. Wildevuur; J. Arends. *The Influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins*. *J. Biomed Mater Res* 1986, 20:773-784.
- [4] Baier, R. E.; A. E. Meyer; J. R. Natiella; R. R. Natiella; J. M. Carter. *Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results*. *J Biomed Mater Res* 1984,18: 327-355.
- [5] Hurbert, T. A.; B. D. Ratner; J. M. Schakenraad; F. J. Schoen. *Some background concepts*. In *Ratner B, Hoffman A, Schoen F, Lemons J, editors. Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine*. New York. Academic Press; 1996. p. 133-164.
- [6] Kilpadi, D. V.; J. E. Lemons. *Surface energy characterization of unalloyed titanium implants*. *J. Biomed Mater Res*, 1994, 28:1419-1425.
- [7] Eriksson, C.; H. Nygren, K. Ohlson. *Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surface during the first 3 weeks in bone*. *Biomaterials*, 2004, 25:4759-4766.



03

Propiedades biológicas

Evaluación de la citotoxicidad del implante dental AVINENT

OBJETIVO

Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de implantes dentales AVINENT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios de citotoxicidad se engloban dentro de los estudios de biocompatibilidad de un material. Los ensayos a realizar para la evaluación de la citotoxicidad están muy regulados, por lo que han sido unificados por la FDA en los Estados Unidos y en Europa siguiendo la norma ISO 10993.

El método utilizado para determinar la citotoxicidad de la superficie de los nuevos implantes dentales AVINENT fue el ensayo de citotoxicidad *in vitro* por contacto directo descrito en la norma ISO 10993-5:1999.

Cultivo celular

Para realizar los ensayos se utilizaron células provenientes de la línea celular MG63, que está formada por células de osteosarcoma humano de tipo osteoblástico, las cuales son ampliamente utilizadas en los estudios biológicos. Para el cultivo, inicialmente se colocaron las células en placas de cultivo junto con 15 ml de medio de cultivo (DMEM, Dulbecco's Modified Tagle Medium, Gibco) sin rojo fetal, el cual fue suplementado previamente con un 10% de suero bovino fetal (FCS, Gibco), un 1% de penicilina/estreptomina, un 1% de piruvato y un 1% de α -L-glutamina, todos Sigma. Las células se mantuvieron a 37° C en un incubador bajo una atmósfera con 5% CO₂. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días.

Para el traspase de las células del frasco de cultivo a la superficie de los materiales se llevó a cabo el procedimiento descrito a continuación.

Para la realización del subcultivo, es decir, el traspaso de las células a los pocillos con los materiales a ensayar, se procedió a lavar las monocapas celulares con una solución salina tamponada PBS (Phosphate Buffered Saline) y luego fueron tripsinizadas con tripsina-EDTA (Ethylene-dinitrilo tetraacetic acid) durante cinco minutos a 37° C para separarlas de la placa. La tripsina es una enzima proteolítica que actúa degradando las proteínas que sirven de unión entre las cé-

Documento elaborado por el **comité científico de AVINENT Implant System S.L.** ⁽¹⁾ con la colaboración del **CREB** (Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica) ⁽²⁾ y el **CTM** (Centre Tecnològic) ⁽³⁾

⁽¹⁾ **Comité científico de AVINENT Implant System S.L.:** A. Cortina, C. Vendrell, E. Falcó, J. Serra

⁽²⁾ **CREB:** A. Mestre

⁽³⁾ **CTM:** J. Caro, M^a D. Riera, J. M. Prado

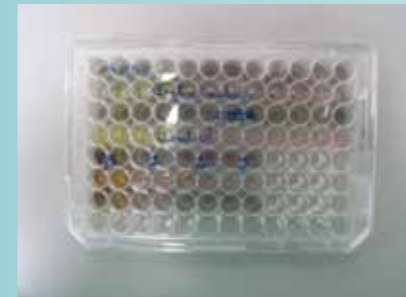


Figura 1. Muestras en medio de cultivo.

lulas de cultivo. Una vez tripsinizadas, se procedió a añadir medio completo para neutralizar la reacción de tripsinización. Luego se concentraron las células mediante centrifugación para eliminar así la tripsina y añadir nuevo medio. Las células fueron resuspendidas y contabilizadas por medio de un hematocitómetro. Partiendo del número de células totales, se realizaron las diluciones necesarias para obtener la cantidad de células por pozo deseada.

Los estudios de citotoxicidad se realizaron en la sala de cultivos del Parc Científic de Barcelona. En este lugar de trabajo es de gran importancia que el ambiente se mantenga estéril.

Los estudios se realizaron con muestras de Ti grado médico, cilíndricas de 5.5 mm de diámetro y 2 mm de espesor con superficie AVINENT, seleccionando distintas condiciones de tratamiento superficial. También se introdujeron en el análisis muestras de Ti grado médico liso sin tratar y muestras control. Estas muestras fueron esterilizadas previamente para eliminar todo tipo de microorganismos y así conseguir un medio adecuado para el cultivo de células.

Ensayo de citotoxicidad

Se realizó el ensayo de citotoxicidad por contacto directo.

Para la evaluación de la citotoxicidad de los materiales se utilizó la prueba WST (Roche). La WST es una sal de tetrazolio (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) la cual es transformada en formazán mediante un complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa y es activo sólo en el caso de células viables. Por lo tanto, la cantidad de formazán producida durante el ensayo, que se evalúa mediante medidas de absorbancia en un espectrofotómetro, está relacionada con el número de células viables, es decir, el número de células metabólicamente activas dentro del cultivo.

En el caso de este proyecto se partió de células de osteoblastos congeladas de la serie MG63.3. Se decidió utilizar este tipo de células porque, aunque la norma ISO 10993 estipula que se utilice otro tipo de células, los implantes van a estar en contacto directo con el hueso de la mandíbula y serán recubiertos por el mismo. Por eso se creyó más conveniente la utilización de células osteoblásticas humanas.

Evaluación de la citotoxicidad del implante dental AVINENT

Análisis de citotoxicidad

Cuando ya se han obtenido los extractos del material en contacto con el medio de cultivo a 24, 48 y 72 horas se puede proceder al estudio de su citotoxicidad. El primer paso consiste en el tratamiento de las células que se encuentran en la incubadora.

Antes de iniciar el estudio de citotoxicidad, los discos metálicos fueron esterilizados, se colocaron los discos en una placa de 40 pocillos con 100 ml de medio de cultivo por pocillo y se incubó durante 12 horas.

La técnica utilizada para el estudio de citotoxicidad se basa en el siguiente proceso: Después de 24, 48 y 72 h de cultivo se introducen 30 μ l de WST, que es una sal de tetrazolio, en los pozos que contienen 300 μ l de medio de cultivo con las células. Debido a la actividad de las deshidrogenasas del mitocondrio celular se produce la rotura de un enlace en esta molécula para dar formazán. Para conseguir un buen nivel de reacción se deja incubar el conjunto durante una hora. Después de ese tiempo se ha producido un cambio de color que se puede medir utilizando un espectrofotómetro modelo PowerWaveX de Bio-Tek Instruments de una longitud de onda de de 450 nm.

Se introducen los parámetros de trabajo utilizando el programa KCJunior. Un número mayor de células provoca una mayor actividad de deshidrogenasas y por lo tanto una concentración mayor de formazán. Este producto provoca un aumento de absorbancia de la muestra en la longitud de onda de trabajo (450 nm), por lo que se verá una disminución clara de ésta con el tiempo si el recubrimiento es citotóxico. La muerte de las células implica una menor actividad y una menor absorbancia de la muestra.

RESULTADOS

Una vez se han realizado las diluciones para obtener una recta patrón y se han incubado las células durante una hora con el reactivo WST-1, se puede proceder a realizar la lectura de la absorbancia. Los resultados de las absorbancias para los ensayos de WST en contacto directo con las muestras y para los controles se muestran en la figura 2. Los análisis se realizan por triplicado para po-

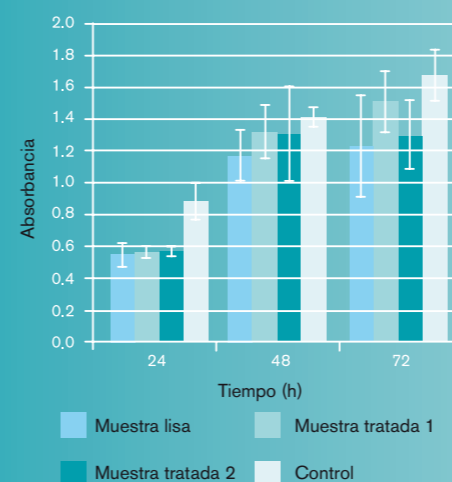


Figura 2. Resultados del ensayo WST en contacto directo con los cilindros después de 24, 48 y 72 horas (n=3).

der evaluar si se debe despreciar algún valor en caso de que se produzca disparidad de resultados.

CONCLUSIONES

El recubrimiento del material no es citotóxico, ya que no se produce la muerte celular como en el caso del control positivo de citotoxicidad. Esto se ve en los valores de absorbancia encontrados. Este razonamiento es válido para los extractos de 24, 48 y 72 horas.

Se ha producido proliferación celular en los dos casos, ya que las células en contacto con los extractos han aumentado con el tiempo de incubación.

Si se comparan los resultados de actividad celular de las células en contacto con los extractos y los del control negativo de citotoxicidad se puede ver que la proliferación no llega al mismo nivel. Esto se muestra de forma más clara en el caso de la incubación a las 72 horas en la figura 2.

Al comparar los resultados de absorbancia entre las muestras lisas y tratadas se puede ver una mejora en la proliferación celular en las muestras tratadas con la superficie AVINENT. No se puede concluir que haya diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular entre las muestras tratadas 1 y 2.

En resumen, a partir de los ensayos realizados se puede llegar a la conclusión que la superficie del implante dental AVINENT no es citotóxica y mejora la proliferación celular osteoblástica.

REFERENCIAS

[1] Norma española UNE-EN ISO 10993-5. Evaluación biológica de productos sanitarios Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro*.

[2] *Cell counting and dye exclusion viability assays using a hemacytometer*. Tech Note. Nalge Nunc International Corp. Vol. 3 (25), 2000.

Ensayos biológicos *in vitro* de los implantes dentales AVINENT

Documento elaborado por el **comité científico de AVINENT Implant System S.L.** ⁽¹⁾ con la colaboración del **CREB** (Centre de Recerca en Enginyeria Biomèdica) ⁽²⁾ y el **CTM** (Centre Tecnològic) ⁽³⁾

⁽¹⁾ **Comité científico de AVINENT Implant System S.L.:** A. Cortina, C. Vendrell, E. Falcó, J. Serra

⁽²⁾ **CREB:** A. Mestre

⁽³⁾ **CTM:** J. Caro, M^a D. Riera, J. M. Prado

OBJETIVO

Determinar la respuesta celular *in vitro* de los implantes AVINENT de Ti grado médico, la morfología celular y la evaluación de la proliferación y diferenciación celular.

La superficie AVINENT es el resultado de una serie de investigaciones científicas sobre características superficiales en implantes dentales con el propósito de obtener la mejor respuesta biológica posible. En concreto, la superficie AVINENT se obtiene gracias a la combinación de un proceso de *shot-blasting* seguido de un proceso de tratamiento electroquímico. El proceso de *shot-blasting* (impacto de partícula) dota a la superficie del implante de una rugosidad estructural óptima. Posteriormente, el proceso electroquímico (anodizado) modifica la microtopografía superficial provocando una porosidad en el óxido de titanio y permite, al mismo tiempo, incorporar elementos químicos (calcio y fósforo) que confieren a la superficie final unas propiedades totalmente biomiméticas.

INTRODUCCIÓN

La morfología de la superficie de un implante, incluyendo la microtopografía y la rugosidad, está íntimamente relacionada con el éxito del proceso de fijación ósea. También el proceso de fabricación utilizado para proporcionar una determinada textura superficial al implante puede introducir cambios químicos en la superficie que también tendrán su influencia en el buen comportamiento clínico. Actualmente, los implantes de titanio y sus aleaciones para uso clínico presentan variaciones respecto a la rugosidad superficial y la composición química, siempre partiendo de la premisa de que el hueso se forma más rápidamente en superficies rugosas que en superficies lisas o pulidas, que son más susceptibles a la formación de tejido conectivo fibroso [1].

Estudios realizados *in vitro* han permitido evaluar el comportamiento de determinadas líneas celulares ante las variaciones de algunas propiedades superficiales, demostrando que la rugosidad superficial afecta a la respuesta celular. En particular, las células osteoblásticas tienden a adherirse más rápido en superficies rugosas [4, 5 y 6].

La diferenciación celular también es mayor en superficies rugosas cuando se evalúan parámetros como la morfología celular, la producción de matriz extracelular, la actividad específica de fosfatasa alcalina y la producción de osteocalcina [1].

La fosfatasa alcalina es un enzima, que se encuentra generalmente adherido a la superficie extracelular de la membrana celular mediante un anclaje a través del terminal carboxilo del fosfatidilinositol-glicano. Existen en forma general dos tipos de fosfatasa alcalina codificadas por cuatro genes diferentes. El primer tipo está constituido por la fosfatasa tejido-dependiente, expresada en el intestino y placenta madura. El segundo tipo de fosfatasa no dependiente del tejido (*tissue non-specific*) se expresa en numerosos tejidos, incluyendo principalmente hueso, hígado y riñones. La fosfatasa alcalina es un indicador precoz de la diferenciación osteoblástica y juega un papel importante en la mineralización de la matriz extracelular. La función de la fosfatasa alcalina es hidrolizar el fósforo orgánico y liberar fósforo inorgánico para la formación de la hidroxiapatita del hueso. Este enzima es indispensable para la formación del hueso, y su secreción o actividad indica la formación de hueso o el inicio de la etapa de diferenciación [2].

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

En el presente estudio se han empleado dos tipos de muestras: lisas y tratadas con superficie AVINENT. Ambas obtenidas a partir de discos de Ti grado médico de 10 mm de diámetro y 2 mm de espesor.

Los discos lisos se prepararon puliéndolos inicialmente con papeles de carburo de silicio y posteriormente con óxido de aluminio, con un tamaño de partícula de 1 μm y 0.05 μm . Una vez pulidos los discos fueron lavados con acetona en ultrasonidos.

Seguidamente los discos tratados con superficie AVINENT también fueron lavados en ultrasonidos.

Todas las muestras utilizadas en este estudio fueron esterilizadas mediante radiación gamma a una intensidad de 25 kGy, y fueron colocadas en placas de poliestireno de 24 pozos.

Ensayos biológicos *in vitro* de los implantes dentales AVINENT

Cultivo celular

Para realizar el presente estudio se utilizaron osteoblastos humanos de la línea celular MG63. Las células fueron colocadas en placas de cultivo, con 15 ml de medio de cultivo (DMEM, Dulbecco's Modified Tagle Medium, Gibco) añadiendo un 10% de suero bovino fetal (FCS, Gibco), un 1% de penicilina/estreptomina, un 1% de piruvato y un 1% de L-glutamina (todos Gibco). Las células se mantuvieron a 37° C en un incubador bajo una atmósfera con 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió cada tres días. Al realizar la cuarta renovación las células fueron lavadas con tampón fosfato (PBS) y trypsinizadas con Trypsin-EDTA (0.25%) en un incubador durante cinco minutos a 37° C.

Morfología celular

Para determinar la variación en la morfología celular en función de la topografía, los cultivos se examinaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (Strata DB 235, FEI Company).

Después de 24 horas de incubación el medio de cultivo se retiró, las muestras se lavaron tres veces con solución tampón fosfato (PBS) y las células se fijaron mediante OsO₄ (1%) en PBS (0.1 M) durante 15-30 minutos. Las muestras fueron deshidratadas mediante la inmersión sucesiva en distintas soluciones de alcohol ter-butílico (50, 75, 90 y 100%). El alcohol se retiró durante la etapa de punto crítico.

Proliferación

La proliferación celular fue cuantificada mediante el ensayo WST (Roche, Alemania). Se cultivaron 10.000 células con 300 µl de DMEM en cada uno de los pozos de cultivo donde se habían colocado las muestras y discos de poliestireno como control positivo. Después de 1,3 y 7 días las células fueron lavadas con PBS y 200 µl de solución de WST (Roche). La WST es una sal de tetrazolio (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno), la cual es transformada en formazán mediante un complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa y es activo sólo en el caso de células viables. Por lo tanto, la cantidad de formazán producida durante el ensayo, que se evalúa mediante medidas de absorbancia en un espectrofotómetro, está relacionada con el número de células viables, es decir, el número de células me-

tabólicamente activas dentro del cultivo. Para conseguir un buen nivel de reacción se dejó incubar el conjunto durante una hora. Después de ese tiempo se produjo un cambio de color que se pudo medir utilizando un espectrofotómetro modelo PowerWaveX de Bio-Tek Instruments con una longitud de onda de de 450 nm.

Diferenciación

Para realizar los ensayos de diferenciación celular se añadieron 100.000 células en cada uno de los pozos. El medio de cultivo fue suplementado con 50mM de ácido ascórbico (Sigma) y 10⁻⁸ mM de dexametasona (Sigma); 3 µl de cada uno de los suplementos fueron añadidos en cada pozo durante 48 horas. El líquido sobrenadante de cada uno de los pozos fue recogido y congelado a -80° C. Los discos fueron lavados dos veces con PBS (Phosphate Buffered Solution) y se empleó M-PER® (Pierce, USA) para lisar las células. El lisado celular fue congelado a -80° C.

El lisado celular obtenido de las distintas muestras fue descongelado para cuantificar la proteína total y la actividad de la fosfatasa alcalina presente en las células. Para la cuantificación de la proteína total se empleó el ensayo BCA (Pierce, USA) según el protocolo especificado por el fabricante. Para realizar el ensayo, se añadieron 25 µl de muestra a 200 µl de reactivo de trabajo en una placa de 96 pozos. La placa fue incubada a 37° C durante 30 minutos y enfriada a temperatura ambiente. Finalmente se obtuvieron los valores de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. Para la obtención de la curva de calibrado, se prepararon varias diluciones de BSA (Bovine Serum Albumin) de 0 a 2000 µg/ml.

Para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina, se añadió en cada pozo 100 µl de cada muestra, 50 µl de solución tampón AMP (0.5M 2-aminoetil-1-propanol, 2 mM MgCl₂) y 50 µl de solución sustrato (10 mM p-nitrofenilfosfato). Para la determinación de la curva de calibrado se prepararon varias diluciones de p-nitrofenol con un rango de concentración de 2·10⁻⁵-2,4·10⁻⁴. La placa de 96 pozos se incubó a 37° C durante 30 minutos. La reacción se paró con la adición de 100 µl de NaOH 3M. Finalmente se realizaron las medidas espectrofotométricas a 405 nm.

Ensayos biológicos *in vitro* de los implantes dentales AVINENT

RESULTADOS

Morfología celular

Los osteoblastos cultivados en los discos lisos de Ti grado médico presentaron una conformación extendida con íntimo contacto con el material después de 24 horas de cultivo. Se observó una débil actividad dorsal, con cortas extensiones citoplasmáticas (filopodios) indicando una baja actividad de desarrollo fenotípico (fig. 2, 3 y 4).

Los osteoblastos cultivados en los discos con superficie AVINENT presentaban una morfología significativamente distinta a la obtenida sobre el sustrato pulido. Los osteoblastos sobre la superficie tratada AVINENT eran células compactas y extendidas, que mostraban abundantes filopodios íntimamente adheridos a la superficie tratada. Esta alta actividad dorsal indica un elevado desarrollo fenotípico. También se observó una tendencia en el posicionamiento de las células en los valles de la superficie adaptando el citoesqueleto a las irregularidades topográficas (fig. 5, 6 y 7). La rugosidad de la superficie condiciona la morfología celular y la posición de las mismas.

Ensayo de proliferación celular

Los resultados indicaron el buen comportamiento *in vitro* de la superficie tratada AVINENT, ya que ofrecía niveles de proliferación semejantes al control positivo y a las muestras lisas en los cuatro tiempos estudiados, poniendo de manifiesto su citocompatibilidad.

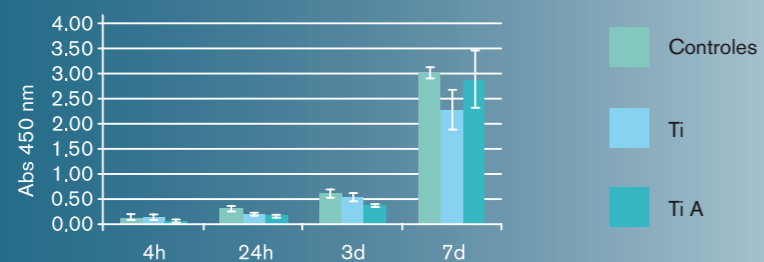


Figura 1. Resultados de proliferación celular. Ti: discos pulidos, y Ti A: discos tratados.



Figura 2. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre titanio liso después de 24 horas de incubación. Se observa la morfología plana de los osteoblastos.



Figura 5. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre la superficie AVINENT después de 24 horas de incubación.

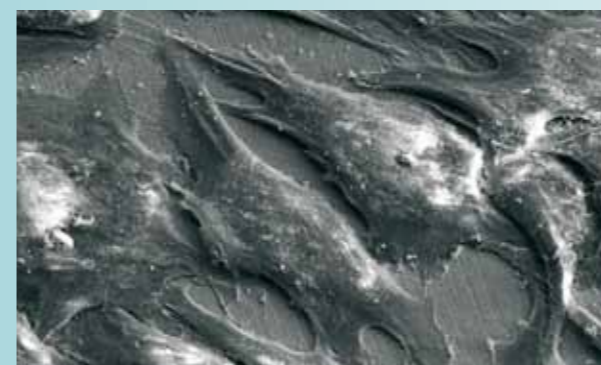


Figura 3. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre titanio liso después de 24 horas de incubación. Se observa una morfología plana de los osteoblastos.



Figura 6. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre la superficie AVINENT después de 24 horas de incubación. Se observa la presencia de extensiones citoplasmáticas (filopodios) en el dorso celular.



Figura 4. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre titanio liso después de 24 horas de incubación. Se observa la presencia de pequeñas extensiones citoplasmáticas (filopodios) en el dorso celular.



Figura 7. Imagen de microscopía electrónica del cultivo de osteoblastos sobre la superficie AVINENT después de 24 horas de incubación. Se observa la presencia de extensiones citoplasmáticas (filopodios) en el dorso celular.

Ensayos biológicos *in vitro* de los implantes dentales AVINENT

Ensayos de diferenciación

Los resultados referentes a la diferenciación de los osteoblastos sobre las dos superficies estudiadas (pulidas y tratadas) se exponen en la figura 8. En ella se puede observar que hay una mayor producción de fosfatasa alcalina en los discos tratados con superficie AVINENT que en los pulidos.

La adición de vitamina 1, 25-(OH)₂D₃ provocó un incremento sinérgico en la producción de fosfatasa alcalina en las muestras tratadas.

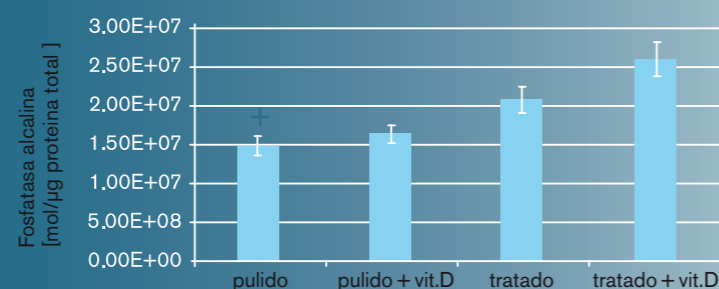


Figura 8. Resultados de producción de fosfatasa alcalina.

DISCUSIÓN

El estudio morfológico mostró variaciones entre las muestras lisas y tratadas en la morfología de los osteoblastos después de 24 horas de incubación. En las superficies lisas las células presentaban una morfología fibroblástica plana con una débil actividad dorsal. Esta configuración extendida reduce la probabilidad de que la célula exprese fenotipos osteoblásticos, ya que estas células se caracterizan por tener una morfología columnar en su fase de secreción *in vivo*. En cambio, en las muestras tratadas los osteoblastos se anclaban a la superficie por medio de contactos focales entre las extensiones citoplasmáticas y los múltiples picos de la topografía. Esto fuerza a la célula a presentar una morfología más osteoblástica con una mayor actividad dorsal.

Las observaciones realizadas en el estudio morfológico fueron corroboradas por los resultados de diferenciación celular. Se observaron mayores concentraciones de fosfatasa alcalina por microgramo de proteína total en los discos tra-

tados, indicando una mayor expresión fenotípica de los osteoblastos en la superficie AVINENT.

Los resultados de proliferación celular pusieron de manifiesto el buen comportamiento *in vitro* de la superficie tratada indicando la adecuada citocompatibilidad del material.

REFERENCIAS

- [1] Lincks, J.; B. D. Boyan; C. R. Blanchard; C. H. Lohmann; Y. Liu; D. L. Cochran; D. D. Dean; Z. Schwartz. *Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent to surface roughness and composition*. *Biomaterials* 19 (1998), 2219-2232.
- [2] Boyan, Barbara D.; Christoph, H. Lohmann; David D. Dean; Victor L. Sylvia; David L. Cochran; Zvi Schwartz. *Mechanisms Involved in Osteoblast Response to Implant Surface Morphology*. *Annu. Rev. Mater. Res.* (2001), p. 357-371.
- [3] Lian, J. B.; G. S. Stein. *Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation*. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 3 (1992), 269-305.
- [4] Bowers, K. T.; J. C. Keller; B. A. Randolph; D. G. Wick; C. M. Michaels. *Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro*. *Int. J. Oral Maxillofac Implants* 7 (1992), 302-310.
- [5] Martin, J. Y.; Z. Schwartz; T. W. Hummert; D. M. Schraub; J. Simpson; J. Lankford; D. D. Dean; D. L. Cochran; B. D. Boyan. *Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)*. *J. Biomed. Mater. Res.* 29 (1995), 389-401.
- [6] Deligianni, D. D.; N. Katsala; S. Iadas; D. Sotiripoulou; J. Amedee; Y. F. Missirilis. *Effect of surface roughness of titanium alloy Ti-6Al-4V on human marrow cell response and on protein absorption*. *Biomaterials* 22 (2001), 1241-1251.



AVINENT®
Implant System

Pol. Ind. Santa Anna I - Apartado 20
08251 Santpedor (Barcelona) · España
T (+34) 902 38 38 48 F (+34) 93 827 38 73
www.avinent.com avinent@avinent.com

