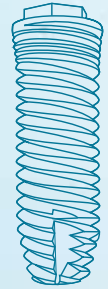


Documentación científica



Índice

° 01 ENSAYOS *IN VITRO*

04 Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.
Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales.

° 02 ENSAYOS *IN VIVO*

18 Evaluación biológica *in vivo* de implantes dentales AVINENT.



Ensayos *in vitro*

Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

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⁾

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

⁽²⁾ **CREB:** A. Mestre

OBJETIVO

Determinar los cambios en la respuesta biológica *in vitro* del Ti6Al4V al aplicar cuatro tratamientos superficiales, mediante la determinación de la energía libre superficial, la adsorción y organización de fibronectina y la proliferación de fibroblastos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Se emplearon discos de Ti6Al4V ELI de 2 mm de espesor y 10 mm de diámetro para su posterior uso en todos los ensayos descritos en el presente informe. A continuación se describe la preparación de cada una de las muestras estudiadas.

a) Superficie pulida (P)

Las muestras se pulieron mediante la aplicación sucesiva de distintos papeles de carburo de silicio. Seguidamente se pulieron con γ -alúmina.

b) Superficie chorreada (S)

Las muestras se trataron con un proceso de shot-blasting utilizando partículas de corindón blanco.

c) Superficie anodizada (P/A)

En primer lugar las muestras se pulieron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado a). A continuación se procedió al anodizado de las muestras, conectándolas en el polo positivo (ánodo) de una fuente de alimentación de corriente continua y sumergiéndola en un electrolito conductor.

d) Superficie Biomimetic Advanced Surface (BAS)

Los discos se trataron con el procedimiento descrito en el apartado b) y posteriormente se anodizaron según el apartado c) considerando el incremento de área real producido por el tratamiento de shot-blasting. En el estudio se indica como S/A (BAS).



Figura 1. Microscopio electrónico Jeol JSM-640

Después de aplicar el tratamiento superficial correspondiente, cada muestra se lavó primero con acetona y después con etanol en ultrasonidos durante 10 minutos.

Microscopía electrónica de barrido

Se empleó el microscopio electrónico de barrido JSM-640 (Jeol, Japón) (fig. 1) para obtener imágenes de las superficies preparadas aplicando un potencial de aceleración de 20kV. También se hizo uso del detector EDS (Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy), integrado en el microscopio, para analizar semicuantitativamente cada una de las superficies estudiadas.

Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

Interferometría

Se caracterizó la rugosidad de las superficies tratadas mediante el uso de un microscopio interferométrico WYCO NT 1100 (Veeco, USA) funcionando en modo VSI (Vertical Scanning Interferometry) (fig. 2). Los parámetros superficiales obtenidos se resumen en la Tabla 1.



Figura 2. Microscopio interferométrico WYCO NT 1100.

SÍMBOLO	DEFINICIÓN	CÁLCULO
Ra	Valor medio de las irregularidades del perfil	$R_a = \frac{1}{NM} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N Z_{ij} $
Rq	Media de la raíz cuadrada de las desviaciones del perfil	$R_q = \sqrt{\frac{1}{NM} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N Z^2(x_i, y_j)}$
Rt	Máxima distancia entre el pico más alto y el valle más profundo	$R_t = R_v + R_p$

Tabla 1. Descripción de los parámetros superficiales obtenidos mediante interferometría óptica.

Ensayo del ángulo de contacto y de la energía libre superficial

La determinación del ángulo de contacto se llevó a cabo mediante el equipo Data Physics OCA 15 (Data Physics Instruments GMBH, Alemania) con la ayuda del software SCA 20. El método utilizado fue el de la gota sésil con un volumen de líquido de 2 µl. Los líquidos utilizados fueron agua ultrapura y diiodometano, realizándose las mediciones en atmósfera saturada del vapor del líquido empleado a temperatura ambiente. Los valores de la componente polar y dispersiva de la tensión superficial para los dos líquidos empleados se muestran en la Tabla 2.

LÍQUIDO	COMPONENTE DISPERSIVA (γ ^d , en mN/m)	COMPONENTE POLAR (γ ^p , en mN/m)
Agua ultrapura ¹	21.8	51
Diiodometano ²	50.8	0

Tabla 2. Valores de la componente polar y dispersiva de la tensión superficial para los líquidos utilizados

La determinación de la energía libre superficial se realizó siguiendo el modelo propuesto por Owens-Wendt-Rabel-Kaelble (OWRK), que utiliza los ángulos de contacto obtenidos con un líquido polar y uno apolar.

$$\cos \theta = 2\sqrt{\gamma_s^D} \left(\frac{\sqrt{\gamma_L^D}}{\gamma_L} \right) + 2\sqrt{\gamma_s^P} \left(\frac{\sqrt{\gamma_L^P}}{\gamma_L} \right) - 1$$

Ecuación 1. Modelo generalizado de Owens-Wendt para el cálculo de las componentes polar y dispersiva de la energía libre superficial para un sólido. Siendo: θ el ángulo de contacto entre el líquido y el sólido; γ_L y γ_s: tensión superficial del líquido y energía superficial del sólido respectivamente; y los superíndices D y P haciendo referencia a la componente dispersiva y polar respectivamente.

Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

Ensayo de organización de fibronectina

Se obtuvo una solución de fibronectina (FN) a partir de plasma humano mediante cromatografía en columna (Millipore, USA). Como fase estacionaria se utilizó gelatina de sacarosa y como fase móvil una solución 4M de urea.

Las fracciones obtenidas se ajustaron a pH 9 con bicarbonato de sodio 0,1 M. La fibronectina se marcó mediante la adición de 10 µl de una solución de FITC (isotiocianato de fluorescina) de 10 mg/ml en DMSO (sulfóxido de dimetilo) por cada ml de solución de proteína/urea/bicarbonato de sodio y la posterior incubación de la solución a temperatura ambiente durante 2 horas.

A continuación se separó la fibronectina marcada con FITC de la urea y de la proteína no marcada mediante cromatografía por exclusión de tamaño y se determinó su concentración mediante espectroscopia UV/Vis.

La solución de fibronectina marcada se diluyó en PBS (tampón fosfato salino) a una concentración de 20 µg/ml. Se depositaron 100 µl de dicha solución sobre cada uno de los discos P, S, P/A y S/A (BAS) y se incubó durante 30 minutos a 37° C.

Se empleó dodecil sulfato de sodio (SDS), diluido al 10% en agua y con NaOH 0,2 M para recuperar la fibronectina adsorbida durante una incubación de 24 h a temperatura ambiente. Cada experimento se repitió seis veces.

La cantidad de FITC-FN se determinó semicuantitativamente mediante espectrofluorimetría, utilizando como longitud de onda de excitación y emisión 494 y 518 nm respectivamente. Como blanco se utilizó una solución al 10% de SDS.

Fijación de la fibronectina adsorbida

Para determinar las posibles diferencias generales en cuanto a la organización de fibronectina en las superficies P, S, P/A, S/A (BAS) se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior para adsorber la FITC-FN (2.5), se fijó mediante la incubación con paraformaldehído al 3% durante 10 minutos y se lavó con una solución de glicina 20mM en PBS.

Para la observación de la FITC-FN fijada se empleó un microscopio confocal (TCP SP5, Leica, Alemania) con un objetivo de 40 aumentos.

Ensayo de proliferación de fibroblastos

Se utilizó un cultivo primario de fibroblastos procedentes del peritoneo de rata (RPFBs) como línea celular. Las células se mantuvieron en frascos para cultivo tipo T75 en un incubador humidificado a 37° C en atmósfera de 5% de CO₂ durante cuatro días. Se depositaron 10.000 células en cada una de las muestras, previamente esterilizadas con radiación gamma a 25 kGy, y sobre TCPS (Tissue Culture Polystyrene) que se utilizó como superficie de control. Después de 4 horas, 24 horas, 3 días y 7 días se añadió el reactivo WST en cada uno de los pozos de cultivo con una proporción de 1:10 y se incubó durante 1 hora a 37° C y en una atmósfera con un 5% de CO₂. A continuación se tomaron 100 µl de cada pozo y se determinó su absorbancia con un espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda.

Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Microscopia electrónica de barrido

Las muestras pulidas (P) presentaban una superficie completamente lisa con la presencia de algunos defectos puntuales típicos del pulido (marcas de pulido) (fig. 3). Las muestras chorreadas (S) presentaban una superficie irregular con aristas afiladas y zonas brillantes correspondientes a la presencia de partículas de alúmina incrustadas en el metal. La superficie anodizada (A) presentaba una topografía homogénea formada por poros de 2-4 micras de diámetro aproximadamente. Las muestras S/A con la superficie BAS ofrecían una micromorfología superficial con una rugosidad importante, con la presencia de alguna partícula de alúmina embebida en el metal combinado con la presencia de poros debidos al proceso de anodizado. Se observó que las aristas de las microirregularidades de las muestras S/A (BAS) habían sido suavizadas por el proceso de anodizado, a diferencia de las de la muestra (S), donde eran más afiladas.

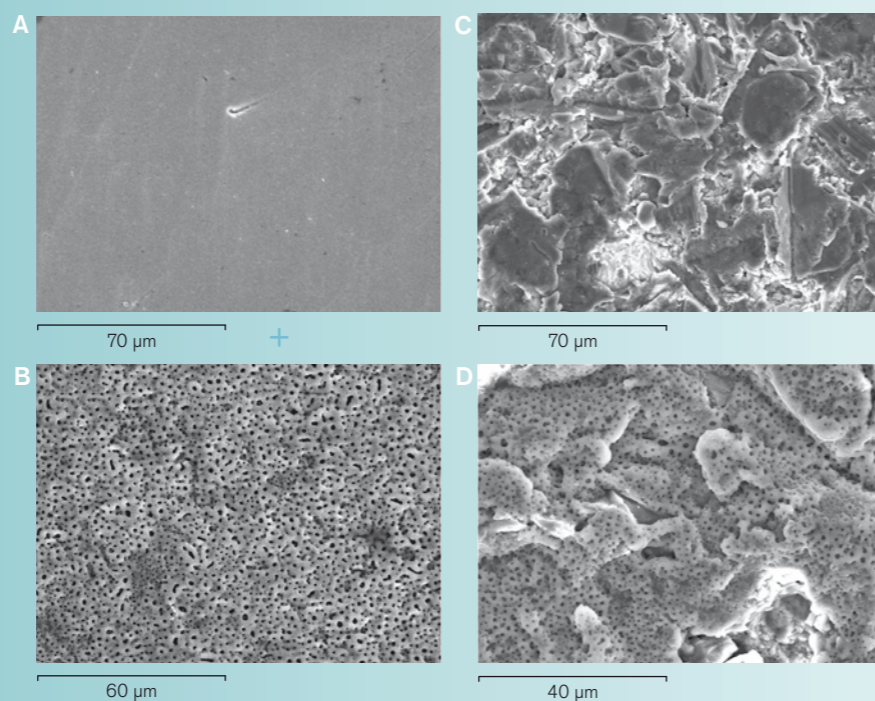


Figura 3. Imágenes de microscopia electrónica de las superficies estudiadas. A) Pulida, B) Anodizada, C) Chorreada y D) BAS.

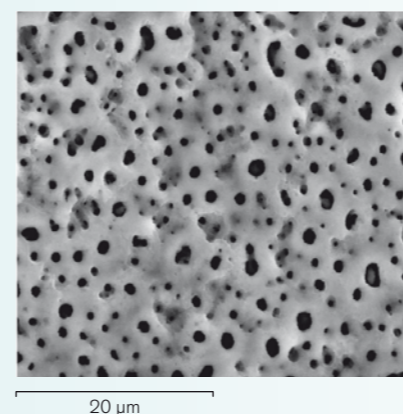


Figura 4. Detalle de la porosidad de la superficie Biomimetic Advanced Surface (BAS).

Las muestras pulidas presentaban una composición química correspondiente a la aleación Ti6Al4V, con desviaciones debidas a la técnica de análisis utilizada. Las muestras anodizadas P/A y S/A (BAS) presentaban un contenido parecido en Ca y P de alrededor del 3% además de la presencia de sodio, presente en varias especies del electrolito. El alto contenido en oxígeno de las muestras anodizadas se debe a la oxidación del material y a la formación, principalmente, de óxidos de titanio. Las muestras chorreadas presentaban un contenido en aluminio superior a las pulidas debido a la presencia de partículas de alúmina incrustadas en la superficie.

Interferometría

Como ya mostraron las imágenes de microscopia electrónica, el tratamiento de anodizado por plasma químico incrementa la rugosidad de las muestras lisas. Sin embargo, no hay diferencias relevantes en los parámetros superficiales estudiados entre las muestras chorreadas (S) y las muestras S/A (BAS) (Tabla 3). Como era de esperar, el tratamiento de chorreado incrementa significativamente la rugosidad.

Beck et al. mostraron un comportamiento similar después de aplicar el anodizado por plasma químico en superficies lisas y rugosas obtenidas por proyección de partículas de vidrio. [3]

	P	P/A	S	S/A
R_a	0.19 ± 0.04	0.68 ± 0.08	2.93 ± 0.08	2.89 ± 0.07
R_q	0.24 ± 0.05	0.83 ± 0.10	3.73 ± 0.08	3.68 ± 0.09
R_t	2.55 ± 0.71	7.27 ± 0.64	32.9 ± 1.41	31.5 ± 2.19

Tabla 3. Parámetros topográficos obtenidos.

Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

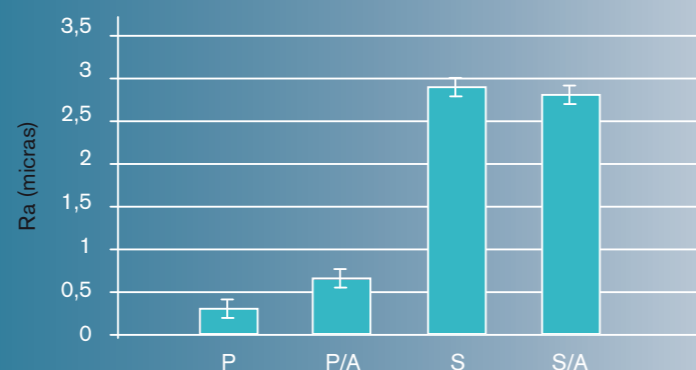


Figura 5. Representación gráfica de los valores de Ra obtenidos. Nótese que el tratamiento de anodizado no causa variaciones significativas en el parámetro Ra en las muestras chorreadas.

Determinación del ángulo de contacto y de la energía libre superficial

Para obtener los valores de energía libre superficial para cada una de las cuatro superficies estudiadas se utilizó el modelo propuesto por Owens-Wendt. Dicho modelo requiere la medida del ángulo de contacto con un líquido polar y un líquido apolar. Por tanto, se determinó el ángulo de contacto para cada superficie con agua (líquido polar) y con diiodometano (la parte polar se considera despreciable).

La Tabla 4 muestra los valores de los parámetros obtenidos para cada una de las superficies.

Muestra	Ángulos de contacto (°)		Energía superficial (mN/m)		
	Θ agua	Θ diiodometano	γ^p_s	γ^d_s	γ^s
P	21,01 ± 4,29	32,54 ± 5,39	28,74	47,13	75,87
P/A	12,72 ± 3,83	21,40 ± 6,75	30,04	49,11	79,15
S	44,37 ± 8,37	45,58 ± 5,08	19,23	44,33	63,56
S/A	0	15,01 ± 7,47	30,99	49,95	80,94

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos superficiales.



Figura 6. Valores del ángulo de contacto medio.

Como se puede observar, el anodizado por plasma químico disminuye el ángulo de contacto (aumenta la hidrofiliidad) de la superficie lisa y de la chorreada. Este comportamiento se produjo con los dos líquidos empleados. Incluso las muestras S/A (BAS) presentaron un ángulo de contacto de 0° (*complete wetting*) cuando se utilizó agua para la medición. El chorreado incrementó el ángulo de contacto para la superficie no anodizada (P y S), pero incrementó la hidrofiliidad en las superficies anodizadas (P/A y S/A (BAS)) (fig. 6).

El anodizado por plasma químico incrementó la energía superficial tanto en las muestras lisas como en las chorreadas, especialmente en la componente polar. El incremento de energía superficial fue mayor en las muestras chorreadas (fig. 7)



Figura 7. Valores obtenidos de energía superficial.

Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

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 hidrofiliidad mejora la interacción entre el implante y el medio biológico, produciendo un incremento en la diseminación celular y en la capa celular. [4, 5, 6, 7, 8, 9] Eriksson et al. realizaron ensayos *in vivo* donde relacionaron la hidrofiliidad de un implante y su capacidad de osteointegración. [10] Por lo tanto, la hidrofiliidad de una superficie es uno de los factores que determinan la biocompatibilidad de un biomaterial y es directamente dependiente de la energía superficial.

Organización de fibronectina adsorbida (FITC-FN)

La observación de la FITC-FN adsorbida en las superficies P, P/A, S y S/A (BAS) se realizó mediante microscopia confocal (fig. 8).

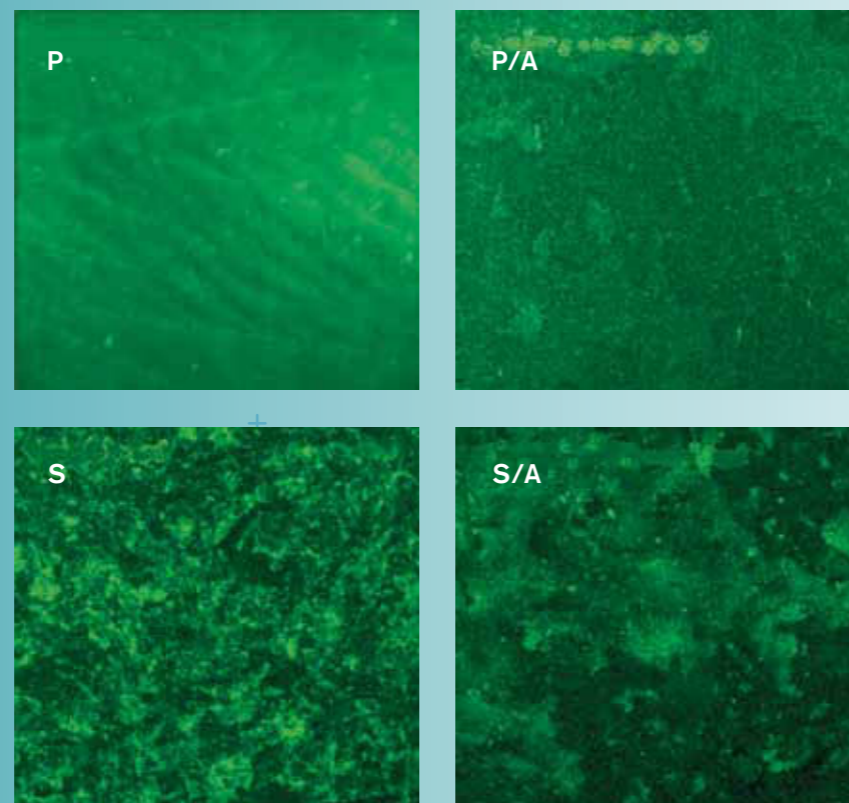


Figura 8. Organización de FITC-FN en las muestras P, P/A, S y S/A (BAS). Imágenes de microscopia confocal a 40x.

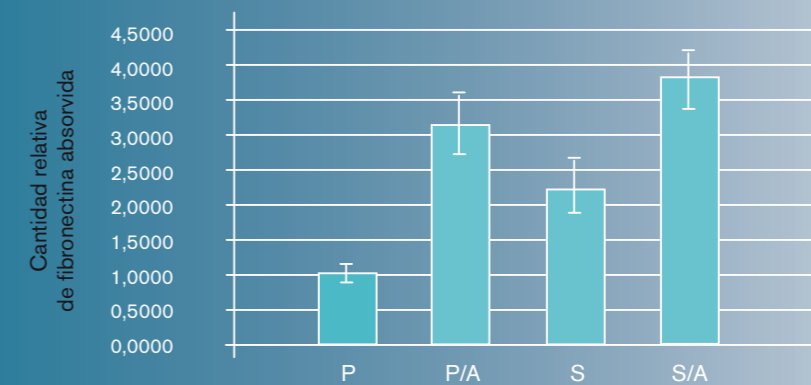
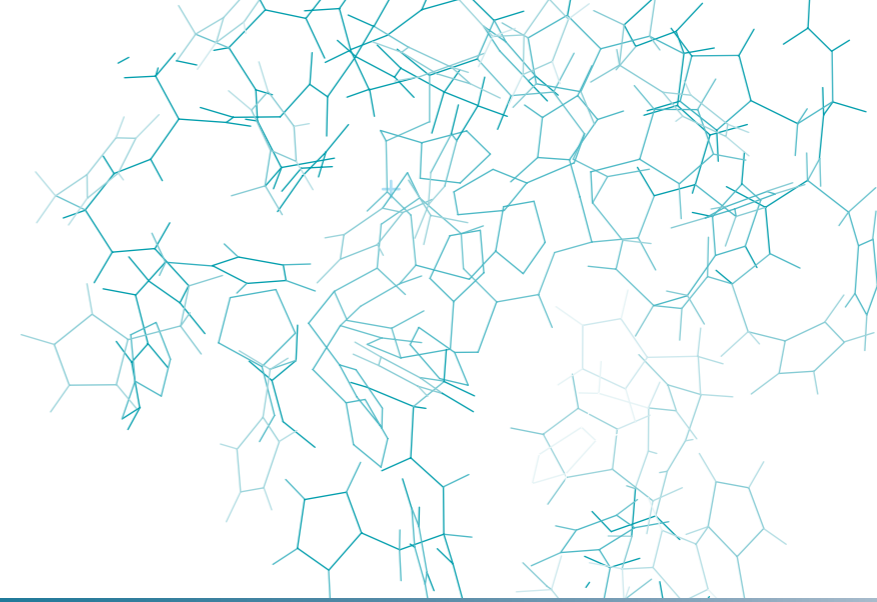


Figura 9. Cantidad adsorbida de FITC-FN relativa a las muestras P.

Las superficies P/A, S y S/A tenían un intensidad mayor que las muestras P, indicando una mayor adsorción de FITC-FN. Las muestras S presentaban una distribución de FITC-FN heterogénea, con puntos con una elevada intensidad, indicando una mayor acumulación de fibronectina, y puntos ligeramente oscuros, donde la adsorción era menos favorable. Las muestras S/A (BAS) mostraban una intensidad más homogénea que las muestras solamente chorreadas, a pesar de ofrecer una rugosidad similar, pero con diferencias significativas en la energía libre superficial (80,94 y 63,56 mN/m respectivamente).

Los resultados cuantitativos de la cantidad de FITC-FN adsorbida se muestran en la Figura 9. Se aprecia que el tratamiento de anodizado por plasma químico incrementa la cantidad de proteína adsorbida comparando las muestras P/A y S/A (BAS) con P y S. El proceso de chorreado duplicó la cantidad de proteína adsorbida respecto a las muestras P. Hay que considerar que tanto el tratamiento de chorreado como el de anodizado incrementan el área real de las muestras, y por tanto las muestras P/A, S y S/A (BAS) ofrecen una mayor superficie disponible para la adsorción.

Respuesta biológica *in vitro* del titanio grado médico.

Estudio comparativo de cuatro tratamientos superficiales

Proliferación de fibroblastos

Se observó un aumento con el tiempo de la proliferación de las células fibroblásticas en todas las superficies estudiadas P, P/A, S y S/A (BAS), siendo la única diferencia entre ellas la velocidad de proliferación de dichas células.

REFERENCIAS

- [1] Erbil Y. Surface tension of polymers. In; *CRC Handbook of surface and colloid chemistry*. Boca Raton. FL: CRC Press: 1997, p.292.
- [2] Vanoss C. J., Lu L., Chaudhury M. K., Good R. J. *Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact-angle measurements on gels*. *J. Colloid. Interf. Sci.* 1989, 128:333-9.
- [3] Beck U., Lange R., Neumann H.-G. *Micro-plasma textured Ti-implant surfaces*. *Biomol. Eng.* In press 2006.
- [4] G. Zhao, Z. Schwartz, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorf, D. L. Cochran, B. D. Boyan. *High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure*. Published On line 27 May 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
- [5] Schrader ME. *On adhesion of biological substances to low-energy solid-surfaces*. *J. Colloid. Interface Sci.* 1982, 20:773-784.
- [6] Schakenraad J. M., Busscher H. J., Wildevuur C. R., Arends J. *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.
- [7] Baier R. E., Meyer A. E., Natiella J. R., Natiella R. R., Carter J. M. *Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results*. *J. Biomed. Mater. Res.* 1984, 18:327-355.

[8] Hurbert T. A., Ratner B. D., Schakenraad J. M., Schoen F. J. *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.

[9] Kilpadi D. V., Lemons J. E. *Surface energy characterization of unalloyed titanium implants*. *J. Biomed. Mater. Res.* 1994, 28:1419-1425.

[10] Eriksson C., Nygren H., Ohlson K. *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.





Ensayos *in vivo*

Evaluación biológica *in vivo* de implantes dentales AVINENT

OBJETIVO

Evaluar el comportamiento biológico *in vivo*, a corto y a medio plazo, del tratamiento superficial BIOMIMETIC ADVANCED SURFACE (BAS) de los implantes dentales AVINENT mediante su implantación en cerdos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal

Se emplearon un total de seis cerdos procedentes de un centro de experimentación de animales de cría. La utilización de los animales fue autorizada por el Comité Ético de la Universitat Autònoma de Barcelona.

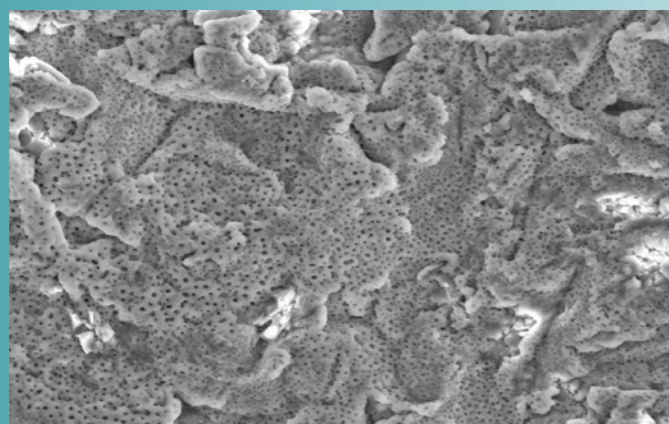


Figura 1. Aspecto de la superficie de los implantes AVINENT.

Implantes colocados

Se emplearon 2 tipos de implantes:

- Implantes AVINENT. Implantes dentales fabricados con la aleación Ti6Al4V ELI y tratamiento superficial BIOMIMETIC ADVANCED SURFACE (BAS), que se obtiene mediante un tratamiento físico-químico y la incorporación de iones de calcio y fósforo durante el proceso. Como resultado de la combinación de estos procesos se obtiene una macrorrugosidad y una microporosidad (fig. 1) que caracteriza la superficie.
- Implantes mecanizados sin tratamiento superficial. Fabricados con la aleación Ti6Al4V ELI y geoméricamente idénticos a los implantes AVINENT.

Se utilizaron implantes endoóseos autorroscantes de 3,8 mm de diámetro y 8,5 mm de longitud para el maxilar superior y de 10 mm de longitud para la mandíbula. Se colocaron 12 implantes en cada animal (6 tratados superficialmente y 6 no tratados). La distribución de los implantes en boca se muestra en la Figura 2.

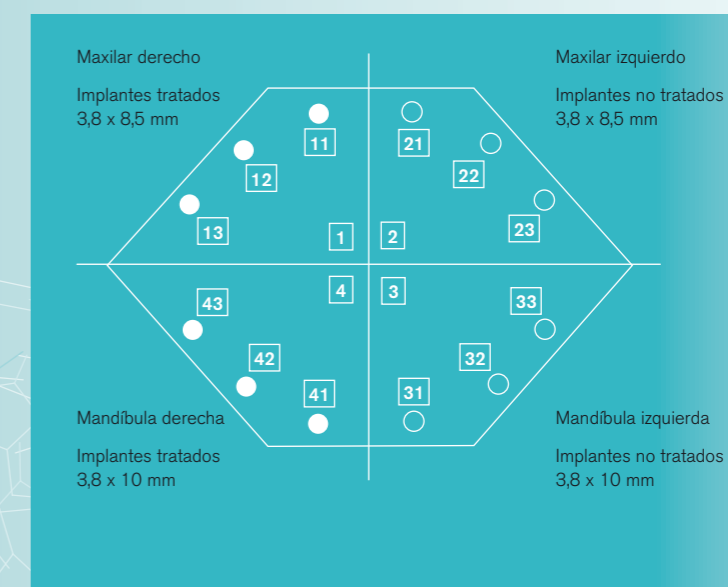


Figura 2. Distribución esquemática de los implantes en boca.

Evaluación biológica *in vivo* de implantes dentales AVINENT

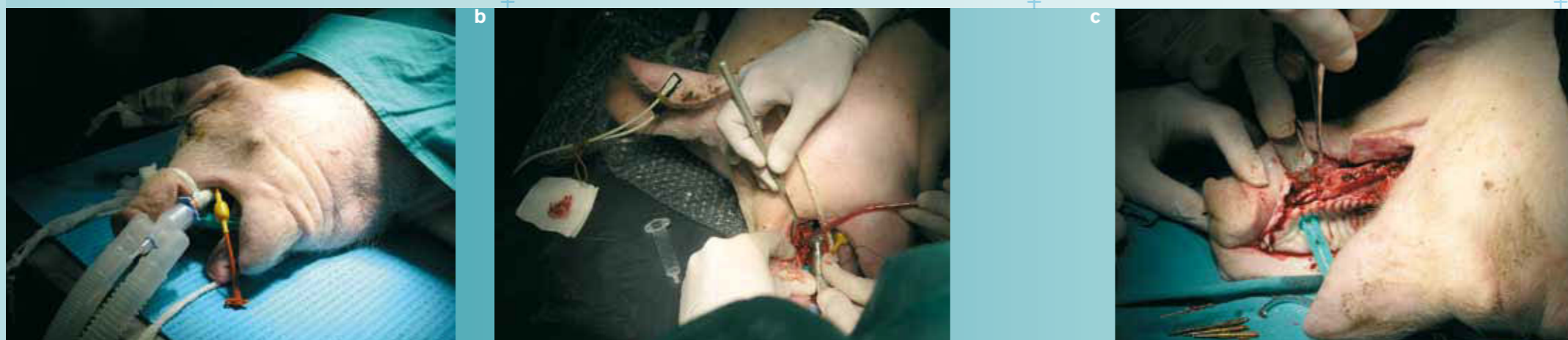


Figura 3. Secuencia de imágenes (a, b, c) de la colocación de los implantes en el maxilar de uno de los cerdos.

Técnica quirúrgica

Las intervenciones quirúrgicas se llevaron a cabo en la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona. La preparación, cuidado y sacrificio de los animales fueron llevados a cabo por un equipo de veterinarios de la citada Universidad. La colocación de los implantes la llevó a cabo un equipo de seis odontólogos y dos enfermeras. Para la intervención de cada uno de los animales, los odontólogos se distribuyeron en diferentes parejas de trabajo.

Se realizaron controles radiográficos antes y después de la intervención (fig. 4) e inmediatamente después del sacrificio de los animales.

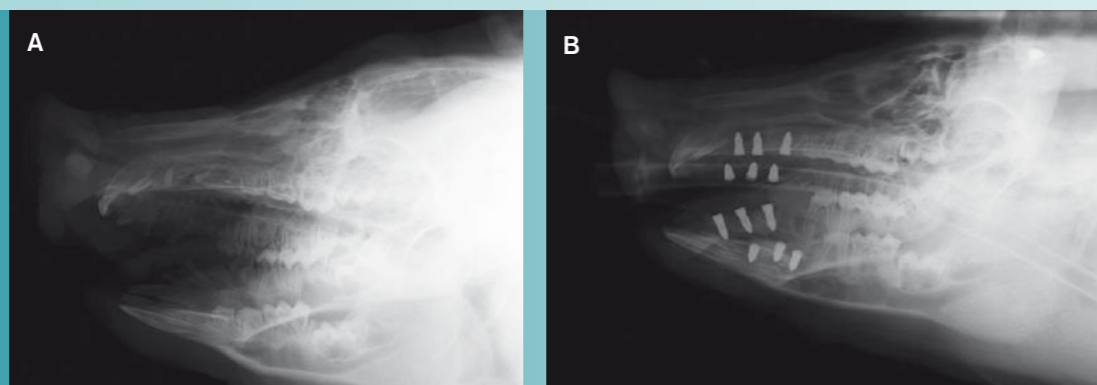


Figura 4. Placas radiográficas del cráneo de uno de los cerdos: (A) antes de la implantación; (B) después de la implantación.

Procesado de muestras para histomorfometría

Tiempos de sacrificio.

Se sacrificaron tres de los cerdos (A, B y C) a los 45 días de la intervención y los tres restantes (D, E y F) a los 90 días.

Preparación de los cortes histológicos.

Después de la extracción de los maxilares se procedió a la preparación de los cortes histológicos tal y como se describe a continuación:

- Fijación en formol: en primer lugar se fijaron los maxilares extraídos mediante la inmersión en formol al 10%.
- Obtención de los cortes histológicos. De cada maxilar se separaron los implantes individualmente, conservando los tejidos circundantes al implante mediante una sierra circular de 0,2 mm de grosor. A continuación se cortaron los implantes longitudinalmente por su línea media con baja velocidad e irrigación abundante para evitar el sobrecalentamiento de la muestra, evitando el deterioro de los tejidos que rodeaban al implante (fig. 5).

Evaluación biológica *in vivo* de implantes dentales AVINENT



Figura 5. Corte de un fragmento de maxilar.



Figura 6. Corte de una muestra incluida en plástico.

c) Los cortes fueron procesados para el estudio en microscopía electrónica, lo cual incluye deshidratación controlada de la muestra para su fijación en resina (hidroxietil-metacrilato), proceso que dura aproximadamente treinta días. Posteriormente, mediante fotocurado se obtiene una cápsula plástica que se recubre con carbono, quedando de esta forma preparada para someterla a estudio morfológico (fig.6).

Análisis histomorfométrico

El estudio histomorfométrico se realizó mediante el análisis de imágenes de las muestras obtenidas mediante microscopía de electrones retrodispersados. Para esta valoración hemos analizado los tejidos calcificados en contacto con la superficie del implante, analizando los siguientes parámetros:

- **Presencia de zonas de osteoinducción**

Osteoinducción se define como la génesis de tejido óseo en zonas tisulares no calcificadas, aisladas o sin contacto con el hueso ya formado, lo cual puede suceder bajo diferentes estímulos [1, 2]. Es necesario indicar que el estudio de una imagen bidimensional del proceso biológico de osteointegración sólo nos puede brindar zonas de osteoinducción aparente.

- **Presencia de zonas de osteoconducción**

Se define como osteoconducción la desviación que sufre el crecimiento del tejido óseo hacia una determinada zona, en este caso la superficie del implante [1, 2, 3]. Se explica por la capacidad que tiene el biomaterial de conducir la formación de nuevo hueso hasta su superficie. Este fenómeno se puede observar con una alta fiabilidad en esta técnica de estudio.

- **Análisis cualitativo-cuantitativo de las espiras óseas en contacto con la superficie del implante**

Finalmente, hemos realizado una tabla de análisis para cada *espira activa* de tejido óseo que se encuentra entre dos hilos de rosca de la superficie del implante (Tabla 1). Para incluir una espira activa en nuestro análisis, ésta debe provenir de una trabécula ósea o de la cortical ósea en la

imagen. Además, debe poseer todos los elementos indicados en la Tabla 1; de otra forma no se aplicará el análisis, pero se comentarán las características del tejido óseo observado. El propósito es obtener un análisis cualitativo y cuantitativo del tejido óseo involucrado en el proceso de osteointegración. En la aplicación posterior de este análisis sólo se utilizarán las abreviaciones indicadas en la Tabla 1. Es importante señalar que, como consecuencia de la técnica de estudio, pueden existir microseparaciones entre la superficie del hueso y el implante. Por ello se han realizado algunas compensaciones en las cantidades obtenidas del análisis del relleno y del contacto, observando la correspondencia que existe entre las superficies. Hemos aproximado siempre a la unidad 0 o 5 más cercana el resultado obtenido.

CONTACTO(C) Y RELLENO(R)	TEJIDOS OBSERVADOS	VALORACIÓN	COMENTARIO
% C % R	Espacios vasculares (EV)	De (+) a (++++)	La presencia de este elemento es vital en las primeras etapas de la formación del hueso. En forma progresiva estos espacios son reducidos por tejido óseo de tipo lamelar [4, 5, 6]. La presencia de lagunas de Howship en sus bordes indica actividad osteoclástica [7, 9].
	Tejido condroide (TC)	De (+) a (++++)	Este tejido se forma en las primeras etapas de la osteointegración. Su presencia es signo de fase temprana de la osificación membranosa [7, 8, 9].
	Hueso fibrorreticular (HFr)	De (+) a (++++)	Este tejido óseo reemplaza al anterior. En la medida en que progresa la maduración ósea, es reemplazado por tejido óseo de tipo lamelar [10, 11].
	Hueso lamelar (Hla)	De (+) a (++++)	Este tejido se deposita en las paredes de los espacios vasculares. Posteriormente conforma la remodelación osteonal que formará los sistemas de Havers [10, 11].
	Remodelación osteonal (Os)	Presencia (+) Ausencia (-)	Representa la tendencia del tejido a formar sistemas de Havers. Es un indicador del avance de la maduración ósea [10, 11, 12].

Tabla 1. Análisis aplicado a cada espira activa de hueso que se encuentre en el estudio.

Evaluación biológica *in vivo* de implantes dentales AVINENT

RESULTADOS

Histomorfometría

De todos los implantes observados se adjuntan los siguientes ejemplos de resultados obtenidos mediante microscopia de electrones secundarios y retrodispersados.

a) Análisis histomorfométrico de un implante sin tratar y un implante tratado con 45 días de evolución intraósea

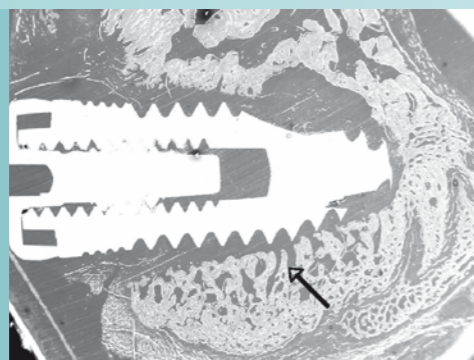
Implante no tratado

La Figura 7 muestra la relación del implante con el tejido circundante. No se observa contacto entre el biomaterial y el tejido óseo en este corte. Tampoco existe la desviación típica del trabeculado hacia la superficie del metal como se observa cuando se producen zonas de osteoconducción.

La Figura 8 muestra la distribución del trabeculado óseo frente a la superficie del implante (Ti). Es una distribución que sigue un patrón lineal frente a la superficie del implante sin contactar con ésta.

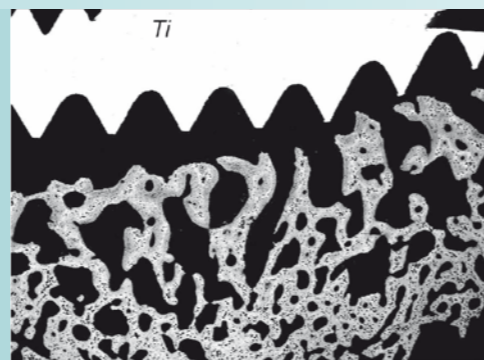
Conclusión

Las Figuras 7 y 8 nos muestran que no hay osteointegración. La distribución del tejido óseo no indica señal de osteoconducción hacia la superficie del implante.



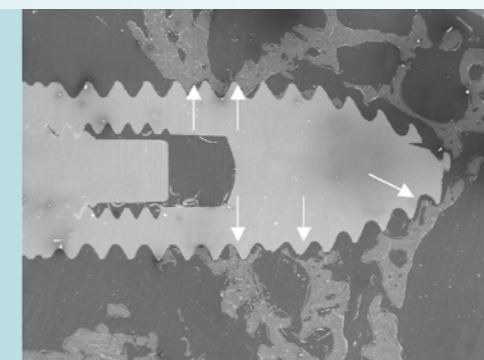
6 mm

Figura 7



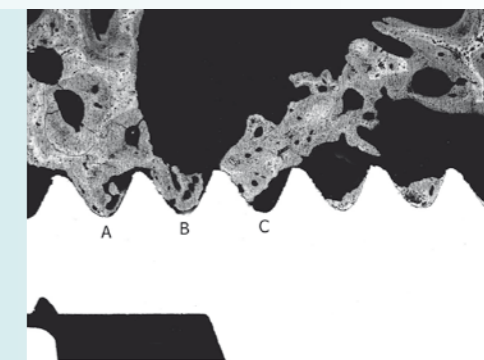
2 mm

Figura 8



5 mm

Figura 9



1 mm

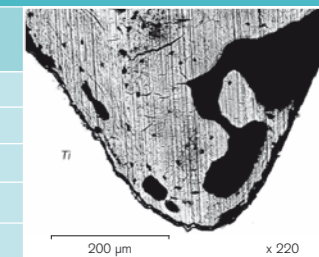
Figura 10

Implante tratado

En la Figura 9 es posible apreciar múltiples zonas de osteoconducción. La base de contacto que forma la extensión ósea (flechas blancas) con la superficie del implante es más ancha comparada con el grosor general de la trabécula ósea de la cual proviene.

La Figura 10 muestra tres espiras activas que provienen del trabeculado que rodea al implante. Éstas son analizadas en las Tablas 2, 3 y 4.

ESPIRA A (45 DÍAS)		
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración
% C 50 % R 75	EV	+++
	TC	+
	HFr	++
	HLa	+++
	Os	-



200 μm

x 220

Tabla 2. Análisis de espira A.

Evaluación biológica *in vivo* de implantes dentales AVINENT

ESPIRA B (45 DÍAS)		
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración
% C 30 % R 65	EV	++++
	TC	+
	HFr	++
	HLa	+++
	Os	-

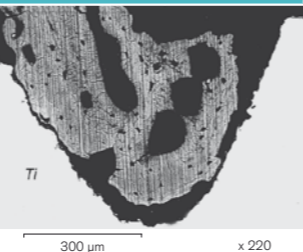


Tabla 3. Análisis de espira B.

ESPIRA C (45 DÍAS)		
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración
% C 25 % R 45	EV	++++
	TC	+
	HFr	+
	HLa	+++
	Os	+

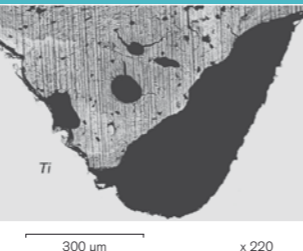


Tabla 4. Análisis de espira C.

ESPIRA D (45 DÍAS)		
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración
% C 30 % R 50	EV	++++
	TC	-
	HFr	++
	HLa	+++
	Os	-



Tabla 5. Análisis de espira D.

ESPIRA E (45 DÍAS)		
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración
% C 00 % R 30	EV	++++
	TC	-
	HFr	++
	HLa	+++
	Os	-



Tabla 6. Análisis de espira E.

La Figura 11 muestra dos espiras activas que se analizarán en las Tablas 5 y 6.

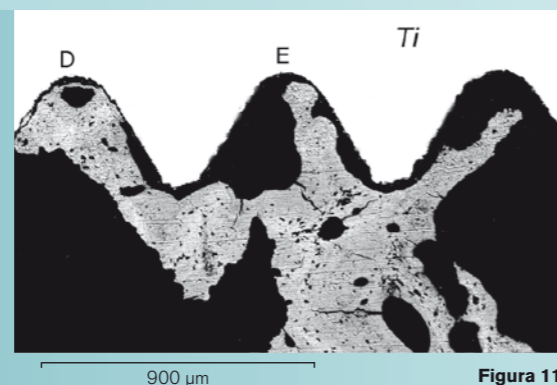


Figura 11

Conclusión

En esta muestra se han observado varias trabéculas óseas conducidas hacia la superficie del implante. El biomaterial ha sido insertado en un lugar con poco tejido óseo; sin embargo, al analizar la relación tejido óseo presente y tejido óseo en contacto con el implante se puede destacar la alta relación lograda. Las espiras encontradas presentan una adecuada madurez ósea.

Evaluación biológica *in vivo* de implantes dentales AVINENT

b) Análisis histomorfométrico de un implante sin tratar y de un implante tratado con 90 días de evolución intraósea

Implante no tratado

La Figura 12 nos muestra la relación del implante con las estructuras adyacentes. Como se puede observar en este corte, el implante (Ti) se encuentra rodeado de tejido óseo (H) y dos elementos dentarios (Ed), sin tomar contacto aparente con ninguno.

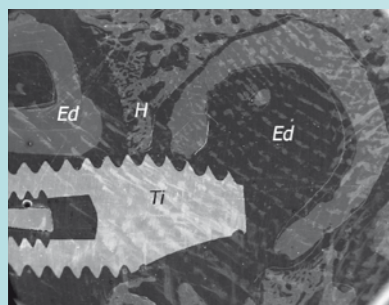


Figura 12

La Figura 13 muestra aumentos de diferentes zonas del implante con los elementos adyacentes. Se puede comprobar que los tejidos no contactan con la superficie del implante.

Conclusión

Este implante, según las imágenes obtenidas, no fue osteointegrado. Todos los tejidos calcificados (hueso, elementos dentarios) se han organizado alrededor del biomaterial sin tomar contacto con el mismo.

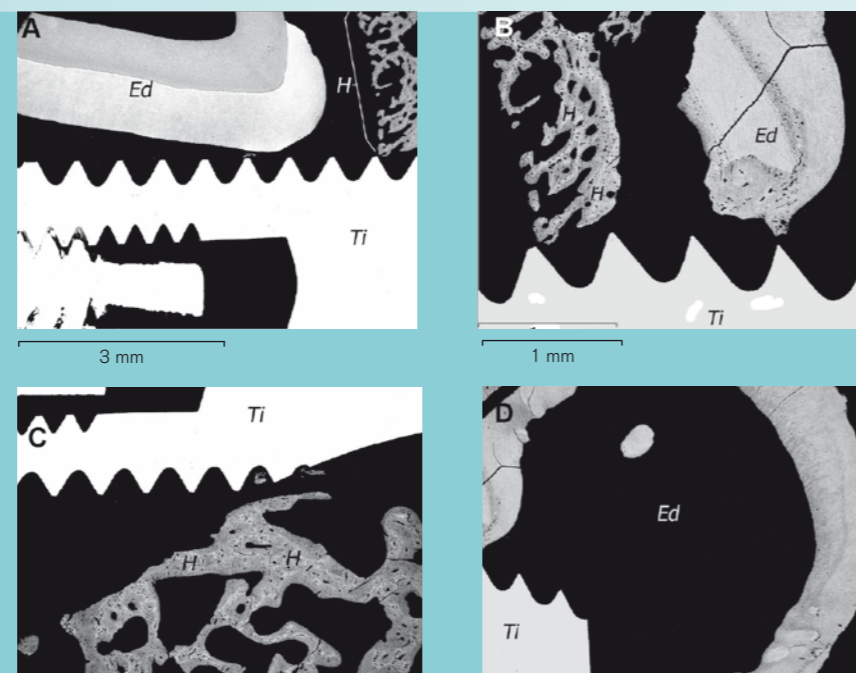


Figura 13

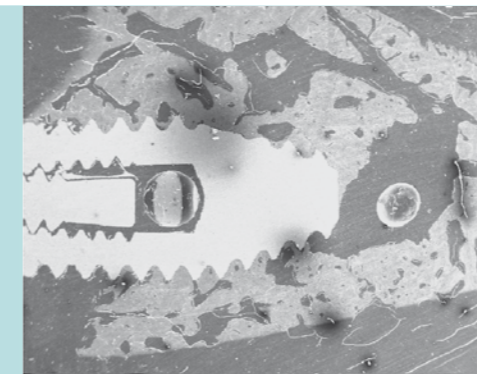


Figura 14

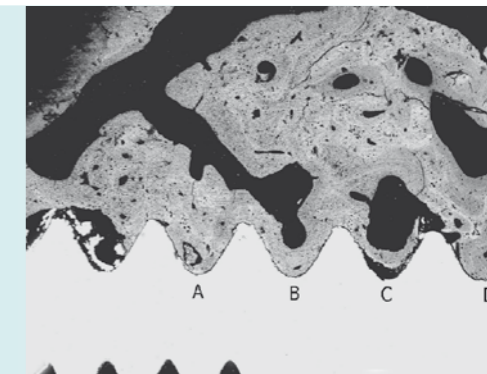


Figura 15

Implante tratado

La Figura 14 muestra la relación del implante con el tejido óseo que le rodea. Se puede observar una apreciable cantidad de espiras óseas activas intimamente relacionadas con la superficie del metal, las cuales serán analizadas a continuación.

En la Figura 15 se observan las espiras activas superiores observadas en la Figura 14. Están señaladas con las letras A, B, C y D, que serán analizadas en las Tablas 7 a 11. La Tabla 11 analiza la espira E, que no se observa en esta imagen.

ESPIRA A (90 DÍAS)		
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración
% C 100 % R 90	EV	+
	TC	-
	HFr	+
	HLa	+++
	Os	+

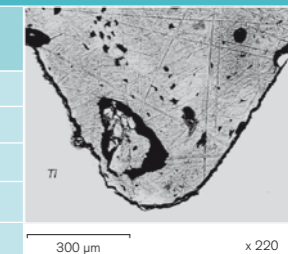


Tabla 7. Análisis de espira A.

Evaluación biológica *in vivo* de implantes dentales AVINENT

ESPIRA B (90 DÍAS)			
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración	
% C 95 % R 85	EV	++	
	TC	-	
	HFr	+	
	HLa	++++	
	Os	-	

Tabla 8. Análisis de espira B.

ESPIRA C (90 DÍAS)			
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración	
% C 20 % R 40	EV	++++	
	TC	-	
	HFr	+	
	HLa	++++	
	Os	-	

Tabla 9. Análisis de espira C.

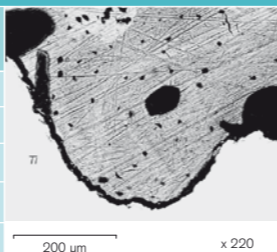
ESPIRA D (90 DÍAS)			
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración	
% C 90 % R 95	EV	+	
	TC	-	
	HFr	+	
	HLa	++++	
	Os	+	

Tabla 10. Análisis de espira D.

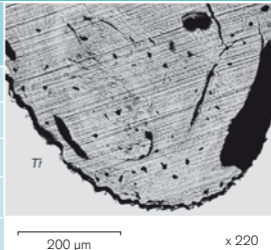
ESPIRA E (90 DÍAS)			
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración	
% C 90 % R 95	EV	+	
	TC	-	
	HFr	+	
	HLa	++++	
	Os	+	

Tabla 11. Análisis de espira E.

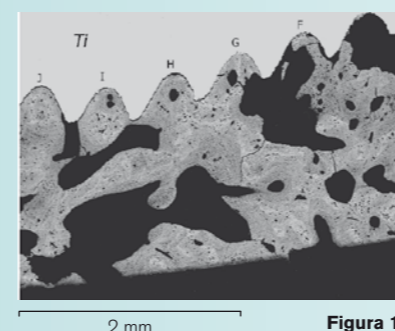


Figura 16

La Figura 16 muestra las espiras activas de la zona inferior del implante de la Figura 14. Están señaladas con las letras F a J y son analizadas en las tablas 12 a 17. La Tabla 17 muestra el análisis realizado en la espira K, que no se observa en esta imagen.

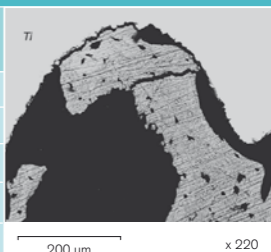
ESPIRA F (90 DÍAS)			
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración	
% C 33 % R 95	EV	++++	
	TC	-	
	HFr	+	
	HLa	+++	
	Os	-	

Tabla 12. Análisis de espira F.

Evaluación biológica *in vivo* de implantes dentales AVINENT

ESPIRA G (90 DÍAS)			
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración	
% C 100 % R 85	EV	++	
	TC	-	
	HFr	++	
	HLa	+++	
	Os	+	

Tabla 13. Análisis de espira G.

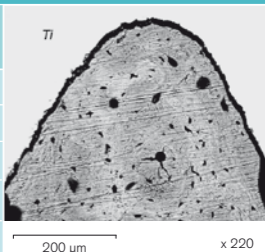
ESPIRA J (90 DÍAS)			
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración	
% C 95 % R 95	EV	+	
	TC	-	
	HFr	+	
	HLa	++++	
	Os	+	

Tabla 16. Análisis de espira J.

ESPIRA H (90 DÍAS)			
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración	
% C 90 % R 95	EV	+	
	TC	-	
	HFr	+	
	HLa	++++	
	Os	+	

Tabla 14. Análisis de espira H.

ESPIRA K (90 DÍAS)			
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración	
% C 60 % R 65	EV	+++	
	TC	+	
	HFr	+	
	HLa	+++	
	Os	-	

Tabla 17. Análisis de espira K.

ESPIRA I (90 DÍAS)			
% Contacto (C) y Relleno (R)	Tejidos observados	Valoración	
% C 100 % R 95	EV	+	
	TC	-	
	HFr	+	
	HLa	++++	
	Os	+	

Tabla 15. Análisis de espira I.

Conclusión

La relación implante-hueso lograda a los 90 días es adecuada. Existe un elevado número de espiras activas con un nivel de madurez y calidad ósea que indica un estado avanzado en el proceso de remodelación del hueso. Esto se puede concluir fundamentalmente gracias al análisis de los diferentes tejidos óseos que componen cada espira activa. Los grandes espacios sin tejido óseo observados en la Figura 14 y en relación con la superficie del implante son compatibles con espacios medulares/vasculares propios de la zona de tejido óseo trabecular del hueso.

Evaluación biológica *in vivo* de implantes dentales AVINENT

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Análisis global de espiras activas en contacto con la superficie del implante

Para el análisis global de la Tabla 18, los valores cualitativos (+), (++) , (+++) y (++++) fueron reemplazados por los valores 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Se ha utilizado un software estadístico para realizar un análisis cuantitativo. De esta forma se puede establecer un promedio de resultados y se puede establecer la tendencia del proceso de maduración ósea.

La importancia del estudio radica en la apreciación del grado de madurez del tejido. Según nuestra revisión, las espiras a 45 días presentan un grado menor de maduración ósea, comparadas con las espiras a 90 días. Esto es un claro indicador de que hubo un adecuado proceso de osteointegración del implante con el tejido óseo, que logró contactar con la superficie del biomaterial.

Existe una clara diferencia de la capacidad osteoconductiva de la superficie BAS del implante tratado comparada con los no tratados aquí analizados. En los tejidos que rodearon a los implantes no tratados no se encontraron ni espiras óseas activas ni reacciones del órgano dental similares a las que se observaron en los implantes AVINENT.

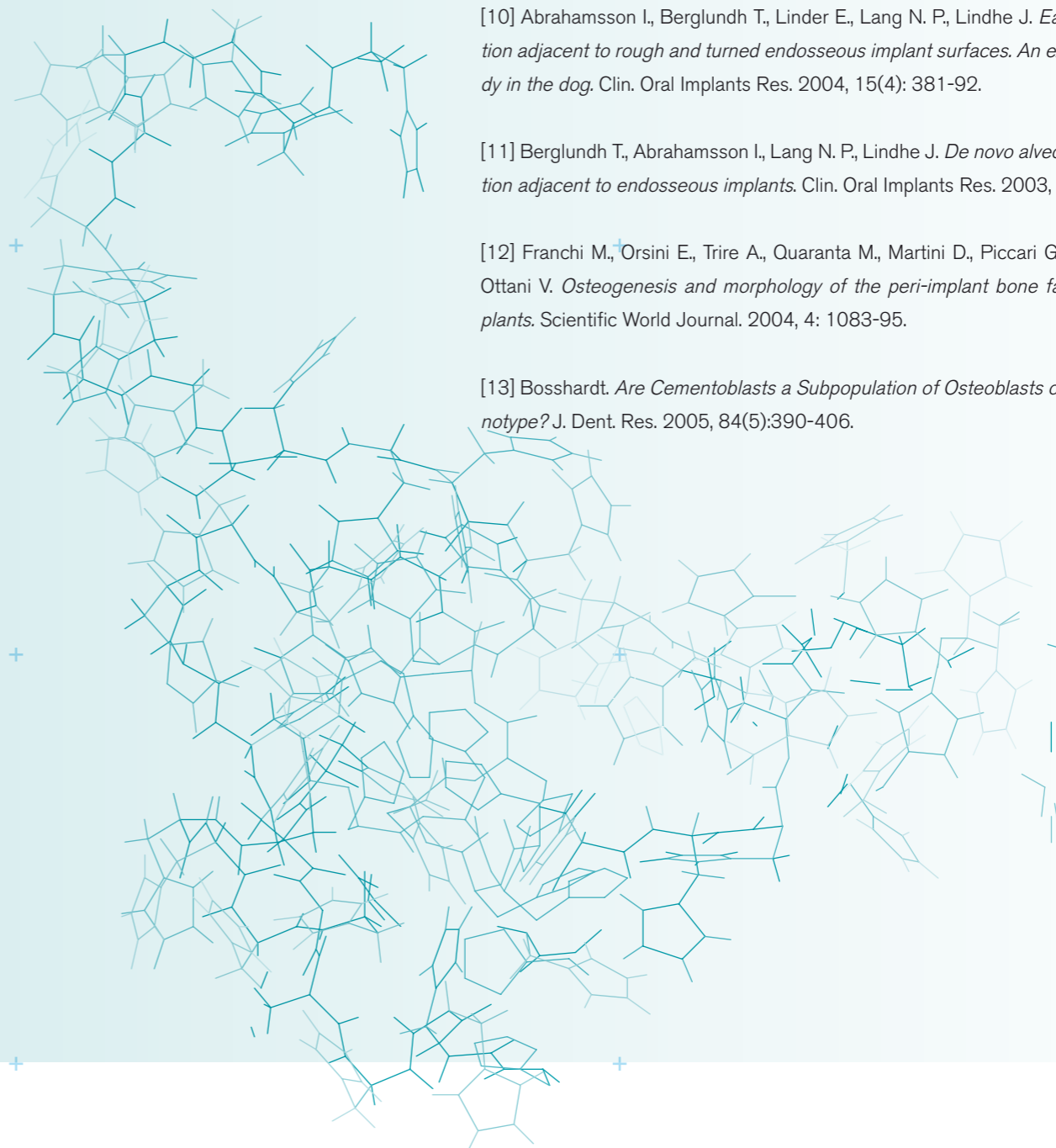
CRITERIO DE ANÁLISIS	RESULTADO 45 DÍAS/90DÍAS	COMENTARIO
%C	16.87 / 69.65	Existen diferencias estadísticamente significativas a favor de las espiras con 90 días de osteointegración en relación al contacto (P-value = 0.0000131196).
%R	58.12 / 77.24	Existe una diferencia estadísticamente significativa a favor de las espiras con 90 días de osteointegración en relación al relleno (P-value = 0.0116824).
EV	3,37 / 2.10	El valor más frecuente para espiras a los 45 días fue (++++). El más frecuente para espiras a 90 días fue (++) . La comparación de promedios entre ambos grupos indica diferencia estadísticamente significativa (P-value= 0.00120435). Esto indica una reducción de los espacios vasculares en las espiras activas de maduración avanzada.
TC	0.62 / 0.068	El resultado indica que hay más presencia de tejido condroide en las muestras a 45 días, con una diferencia estadísticamente significativa (P-value = 0.000146038). Por lo tanto, las espiras activas de 90 días han evolucionado positivamente.
Hfr/HL	1.75/2.87/1.31/3.55	La relación es siempre favorable hacia HL, lo que significa que éste es el tejido calcificado predominante, tanto en las muestras de 45 días como en las de 90. Además, las muestras a 90 días poseen más HL, lo cual indica que el tejido HFr está siendo reemplazado. Esta es la tendencia natural de un hueso en maduración.
Os	12,5% / 65.5%	Un 12,5% de las muestras con 45 días presentan osteonas, frente a un 65% de las muestras a 90 días.

Tabla 18. Análisis global de las espiras activas del estudio.

Evaluación biológica *in vivo* de implantes dentales AVINENT

REFERENCIAS

- [1] Albrektsson T., Johansson C. *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration*. Eur. Spine J. 2001, 10 Suppl. 2:S96-101.
- [2] Dawidowicz A., Pielka S., Paluch D., Kuryszko J., Staniszevska-Kus J., Solski L. *Application of elemental microanalysis for estimation of osteoinduction and osteoconduction of hydroxyapatite bone implants*. Polim. Med. 2005, 35(1):3-14.
- [3] Lu X., Leng Y., Zhang X., Xu J., Qin L., Chan C. W. *Comparative study of osteoconduction on micromachined and alkali-treated titanium alloy surfaces in vitro and in vivo*. Biomaterials 2005, 26(14):1793-801.
- [4] Carrillo J. M., Sopena J. J., Rubio M., Redondo J. I., Serra I., Soler C. *Experimental use of polyamide bands in combination with intramedullary pinning for repair of oblique femoral fractures in rabbits*. Vet. Surg. 2005, 34(4): 387-92.
- [5] Dasso, G, Fernández, M. S. y Arias J. L. *Reparación ósea mediante aloimplantes sometidos a diferentes métodos de conservación en conejos*. Arch. Med. Vet. 1998, 30(2): 57-66.
- [6] Winet H., Albrektsson T. *Wound healing in the bone chamber: neovascularization during transition from the repair to the regenerative phase in the rabbit tibial cortex*. Int. J. Oral Maxillofac. Implants 1988, 3(2): 99-107.
- [7] Manzanares M. C., Franch J., Carvalho P., Belmonte A. M., Tusell J., Franch B., Fernández J. M., Cleries L., Morenza J. L. *BS-SEM evaluation of the tissular interactions between cortical bone and calcium-phosphate covered titanium implants*. Bull Group Int. Rech. Sci. Stomatol. Odontol. 2001, 43(3): 100-8.
- [8] Goret-Nicaise M., Manzanares M. C., Nolmans E., Bulpa P., Dhém A. *Calcified tissues involved in the ontogenesis of the human cranial vault*. Anat. Embryol. 1988, 178: 399-406.
- [9] Manzanares M. C., Franch J., Carvalho P., Montesdeoca J., García J., Greco Y., Belmonte A., Delafuente M., Serra I. *The role of calcified tissues in the different stages of implant osteointegration*. Dent. Med. Probl. 2004, 41(2): 179-191.
- [10] Abrahamsson I., Berglundh T., Linder E., Lang N. P., Lindhe J. *Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog*. Clin. Oral Implants Res. 2004, 15(4): 381-92.
- [11] Berglundh T., Abrahamsson I., Lang N. P., Lindhe J. *De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants*. Clin. Oral Implants Res. 2003, 14(3): 251-62.
- [12] Franchi M., Orsini E., Trire A., Quaranta M., Martini D., Piccari G. G., Ruggeri A., Ottani V. *Osteogenesis and morphology of the peri-implant bone facing dental implants*. Scientific World Journal. 2004, 4: 1083-95.
- [13] Bosshardt. *Are Cementoblasts a Subpopulation of Osteoblasts or a Unique Phenotype?* J. Dent. Res. 2005, 84(5):390-406.





AVINENT®

Implant System

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

