
Tesis doctoral

*INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LAS PARTÍCULAS
DESPRENDIDAS AL MEDIO FISIOLÓGICO EN IMPLANTES DENTALES
COLOCADOS A NIVEL ÓSEO*

Juan Carlos Vara de la Fuente



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la licència [Reconeixement-
NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

[ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0
Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

This doctoral thesis is licensed under the [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0
International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

**INFLUENCIA DE LA NATURALEZA
DE LAS PARTÍCULAS DESPRENDIDAS
AL MEDIO FISIOLÓGICO
EN IMPLANTES DENTALES
COLOCADOS A NIVEL ÓSEO**



Universitat Internacional de Catalunya

JUAN CARLOS VARA DE LA FUENTE
DIRECTOR – DR. JAVIER GIL MUR

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA

A mi padre, Artemio Vara que me enseñó el camino y a Alejandro Padrós Fradera, que me ayudó a caminar.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido en la realización de mi Tesis Doctoral:

Al Dr. Javier Gil Mur, director de esta investigación, por su apoyo y dedicación constante

A la Universidad Internacional de Catalunya, a la escuela de Doctorado a su directora Dra. Nuria Casals, al director de la CAD de Medicina y Ciencias de la Salud Dr. Joan Bosch, a la Dra. Marta Gámiz y a la Sra. Sonia Soriano.

A la Universidad Politécnica de Catalunya a José María Manero catedrático y a los investigadores Meritxell Molmeneu, Miquel Punset y Noelia Aparicio (muy especialmente a Meritxell, por su tiempo y sus enseñanzas).

A la Dra. Begoña Bosch, investigadora de la Universitat Internacional de Catalunya y al director del Instituto de Bioingeniería Dr. Román Pérez, así como el decano de la Facultad de Odontología Dr. Luis Giner Tarrida.

A Klockner por su contribución y apoyo incondicional en la realización de la Tesis Doctoral y en especial a Mercedes Roldan, Alejandro Padrós Roldan y Jordi Martínez.

Al Barcelona Dental Institute y en especial al Dr. Roberto Padrós y la Srta. Yolanda Cayero.

A la Dra. Eva María Vara por ser mi hermana y apoyarme siempre.

A mis amigos y compañeros en la Universidad de La Salle: Dr. Alejandro Estrada, Dr. Juan Delgado y Alberto Payán.

A mis amigos Fernando Blázquez, Salvador Castaño y José María Chinchurreta.

Y por supuesto a mi mujer, Miriam Chinchurreta.

RESUMEN

El objetivo de la odontología moderna es intentar restablecer los contornos normales, la funcionalidad, la estética y el bienestar del paciente.

Los implantes dentales han demostrado ser un tratamiento predecible a medio y largo plazo con tasas de supervivencia mayores al 95%

La inserción de los implantes dentales conlleva un desprendimiento de partículas de la superficie rugosa de titanio en las zonas del lecho óseo.

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es el análisis de estas partículas para implantes dentales de titanio y Ti-6Al-4V y determinar la influencia en el comportamiento biológico.

Se colocaron 41 implantes a nivel de cresta ósea en costillas de bovino, siguiendo las especificaciones del fabricante tanto en el fresado como en la inserción del implante. Las costillas fueron cortadas y escaneadas con microtomografía, donde se observó una pequeña cantidad de partículas desprendidas. La extracción de las partículas se realizó por calcinación en horno. Al no tener muestra suficiente para poder realizar los estudios, se compraron partículas de titanio c.p. y Ti-6Al-4V de 15 micrómetros.

Se analizó la superficie específica, la granulometría y la morfología de estos materiales en forma de polvo, así como la citotoxicidad, la respuesta inflamatoria que generan estas partículas y la cantidad de iones que liberan al medio estos materiales.

Las muestras de Ti-15 μ m presentan unas características muy similares a las muestras de Ti6Al4V-15 μ m, sin presentar diferencias significativas en cuanto a superficie específica y valor medio de diámetro equivalente de partícula.

A la vista de los resultados, se confirmaría una cierta tendencia al incremento del efecto citotóxico celular sobre fibroblastos humanos (tejido gingival) de las partículas de polvo de Ti6Al4V respecto a las de titanio.

La supervivencia celular en los cultivos con extractos de la aleación de Ti6AL4V es inferior comparada con la de titanio puro.

Tanto a nivel génico como proteico a las 48 horas la aleación de Ti6AL4V presenta mayores niveles de los marcadores de inflamación.

Por lo tanto, existe una tendencia que la aleación presenta una mayor toxicidad y una mayor respuesta pro-inflamatoria.

ÍNDICE

1 - INTRODUCCIÓN	9
1.1 - Introducción a la implantología	9
1.2 - Mecanobiología ósea	12
1.2.1 - Descripción del tejido óseo	12
1.2.2 - Composición del hueso	15
1.2.2.1 - Matriz ósea extracelular	15
1.2.2.2 - Osteoclastos	16
1.2.2.3 - Osteoblastos	17
1.2.2.4 - Osteocito	18
1.2.2.5 - Células de borde o revestimiento	18
1.2.3 - Metabolismo óseo	19
1.3 - Clasificación ósea	26
1.3.1 - Clasificación ósea en función de la densidad	27
1.3.1.1 - ¿Como identificamos la densidad ósea del paciente?	33
1.3.2 - Clasificación ósea según la anatomía del reborde	38
1.4 - Estabilidad primaria	39
1.4.1 - ¿Como medimos la estabilidad primaria?	41
1.4.2 - Factores que modifican la estabilidad primaria	48
1.4.2.1 - Factores dependientes del paciente	48
1.4.2.2 - Factores que dependen del implante	49
1.4.2.2.1 - Material del implante	49
1.4.2.2.2 - Macrogeometría del implante	53
1.4.2.2.3 - Microgeometría del implante	58
1.4.2.3 - Factores dependientes de la técnica quirúrgica	64
1.4.2.3.1 - Fresas de densificación	65

1.4.2.3.2 – Uso de osteotomos	67
1.4.2.3.3 – Infrafresado del lecho	68
1.5 - Partículas de titanio	68
2 – OBJETIVOS	73
3 - MATERIALES Y METODOLOGIA	73
3.1 - Superficie específica - ASAP 2020 (BET)	85
3.2 – Granulometría	86
3.3 - Microscopia electrónica de barrido (SEM)	88
3.4 - Liberación de iones metálicos	88
3.5 - Ensayo de citotoxicidad	90
3.6 - Evaluación de la respuesta inflamatoria	93
4 – RESULTADOS	100
4.1 - Superficie específica	100
4.2 – Granulometría	101
4.3 - Microscopia electrónica	102
4.4 - Liberación de iones metálicos	104
4.5 - Ensayo de Citotoxicidad	106
4.6 - Evaluación de la respuesta inflamatoria	107
5 - CONCLUSIONES	114
6 – REPERCUSIONES Y RECOMENDACIONES CLÍNICAS	118
7 – BIBLIOGRAFÍA	120
8 – ANEXOS	146

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 - INTRODUCCIÓN A LA IMPLANTOLOGÍA

La investigación en odontología ha crecido de forma exponencial en los últimos años. En los años 90 se publicaron en revistas indexadas en "pubmed" un total de 7270 artículos con el término Mesh "dental implant". Entre el año 2000 y 2010 los artículos publicados ascendieron a 13075 y en los últimos 10 años se publicaron un total de 25707 artículos. En términos de porcentaje, en los últimos diez años se ha publicado un 353% más que en los años 90. Eso quiere decir el interés por mejorar la implantología ha crecido entre los investigadores y los clínicos, con el fin de mejorar la predictibilidad de los tratamientos realizados y mejorar la satisfacción de los pacientes.

Pero, aunque creamos que la odontología y en su defecto la implantología es algo moderno, lo cierto es que desde la era prehistórica se viene realizando la sustitución de piezas dentarias de diferentes formas. Los primeros hallazgos fueron encontrados en la civilización china, los cuales empleaban bambú para el reemplazo de los dientes. La cultura egipcia utilizaba tallas de madera para sustituir los dientes y la cultura inca y maya, empleaban conchas marinas, incrustando dichos elementos en el hueso, con el fin de dotar de fijación a la estructura.

Es en la época moderna, en los años 60, cuando el profesor Branemark, en la universidad de Götemburgo (Suecia), descubrió la estrecha relación entre el hueso y el titanio. Estaba investigando la circulación sanguínea en los fenómenos de reparación ósea, para lo cual, introdujo unas cámaras de titanio en el interior de una fractura. Al retirarlas para estudiar los resultados, descubrió la fijación tan íntima entre el titanio y el hueso (1).

Por otro lado, a finales de la década de los 60 A. Schroeder, de la Universidad de Berna (Suiza), comenzó a evaluar la integración del tejido blando con varios materiales de implantes; además fue el primero en documentar el contacto hueso-implante mediante secciones histológicas no descalcificadas (2). Ninguno de los dos equipos inicialmente se conocía, ya que los primeros estudios fueron publicados en revistas locales de sus países de procedencia, por lo que trabajaron de forma independiente.

Años más tarde se publican los primeros estudios clínicos de pacientes portadores de implantes y se acuña el término osteointegración, el cual hace referencia al contacto directo del hueso con el implante en ausencia de tejido conectivo ni movilidad (3).

El objetivo de la odontología moderna es intentar restablecer los contornos normales, la funcionalidad, la estética y el bienestar del paciente. En otras palabras, nuestro deber es devolver al paciente todo aquello que había perdido.

Los implantes dentales han demostrado ser un tratamiento predecible a medio y largo plazo con tasas de supervivencia mayores al 95% (4,5).

Un implante dental es un elemento de material aloplástico que se inserta quirúrgicamente en un reborde óseo residual, fundamentalmente con la intención de utilizarlo como soporte para una prótesis (6).

Aún siendo un tratamiento altamente aconsejado, no cabe duda de que existen complicaciones, tanto biológicas como mecánicas.

Las complicaciones biológicas principales son las llamadas patologías periimplantarias. Estas patologías son principalmente dos: La mucositis, la cual está caracterizada por una lesión inflamatoria de los tejidos blandos alrededor de los implantes en ausencia de pérdida de soporte óseo, mientras que la periimplantitis se caracteriza por una inflamación de la mucosa periimplantaria con pérdida ósea progresiva, además de sangrado al sondaje y/o supuración (7). Lee y colaboradores, en un estudio publicado en 2017, reportaron una prevalencia de mucositis del 46.83% de los pacientes en el 29.48% de los implantes. Por su parte la periimplantitis fue diagnosticada en el 19.83% de los pacientes y el 9.25% de los implantes (8). En un artículo publicado recientemente, en la universidad Complutense de Madrid, reportaron cifras de periimplantitis en hasta el 56,6% de los pacientes (9)

Las complicaciones mecánicas y técnicas son aquellas complicaciones que derivan de los componentes protésicos. Las más frecuentes son el desconchamiento de la cerámica de las coronas con componentes cerámicos, el aflojamiento o fractura de los tornillos en el caso de las prótesis atornilladas y el descementado de las prótesis cementadas.

1.2 - MECANOBIOLOGIA ÓSEA

1.2.1 - Descripción del tejido óseo

El hueso, de forma general, está definido como una pieza dura y resistente del esqueleto de los animales vertebrados, de color blanco amarillento; está formado por sustancia orgánica y sales minerales, y envuelta por una membrana fibrosa. Principalmente podemos encontrar dos tipos de hueso; hueso cortical y hueso trabecular.

El hueso cortical, es un tejido sólido que en su interior contiene una red de finos conductos longitudinales (canales de Havers) y transversales (conductos de Volkmann), que alojan vasos sanguíneos y fibras nerviosas. El hueso cortical constituye principalmente la diáfisis (parte central) de los huesos largos, la cual adopta una forma cilíndrica para contener la médula ósea. Este tipo de hueso tiene baja porosidad, aproximadamente entre 5 y 10%. Tiene la característica de ser resistente a la torsión, flexión y al corte (10).

Por otro lado, el hueso trabecular, es un entramado tridimensional de trabéculas óseas ramificadas, que forman un sistema de espacios intercomunicados. Se admite que el hueso trabecular es poroso, poco homogéneo y estructuralmente anisótropo (11). En el interior de cada trabécula se encuentra la médula ósea, compuesta principalmente por células madre. Este tipo de hueso es la parte metabólica más activa del esqueleto, y se encuentra en las epífisis y metáfisis de los huesos largos, constituyendo la mayor parte del cuerpo vertebral. Contrariamente al cortical, posee una alta porosidad y tiene la capacidad de resistir fuerzas de comprensión y tensión. Se ha considerado que la estructura de las trabéculas está orientada a la función (12-14).

El tejido óseo es una estructura pasiva por sí sola, pero que va a responder a los diferentes estímulos mecánicos generando cambios en su densidad, forma y estructura interna.

Las principales funciones que se le han encomendado al hueso son:

- Dotar de forma y soporte al cuerpo.
- Protección de los órganos internos.
- Actuar de anclaje para los diferentes músculos, permitiendo así la movilidad del cuerpo.
- Abastecer de minerales al resto del organismo.
- Suministrar médula ósea, imprescindible para el desarrollo y almacenamiento de las células sanguíneas.

Por lo tanto, el hueso tiene la capacidad de reorganizarse con el fin de optimizar la función para la que ha sido diseñado. El tejido óseo está en continuo crecimiento y desarrollo, sujeto a procesos químicos, físicos y biológicos (15).

Los cambios presentes en la estructura ósea como consecuencia de los estímulos mecánicos también se han observado en los maxilares. Autores como MacMillan y Parfitt han descrito las características óseas en las diferentes zonas de los maxilares. Esto es debido a que cumplen funciones biomecánicas diferentes (16,17). La mandíbula es un hueso independiente del cráneo, que está diseñado para absorber las fuerzas. Por consiguiente, cuando están presentes los dientes, tanto el hueso cortical como el trabecular son más gruesos y densos. Por otro lado, el hueso maxilar superior es una estructura unida al resto del cráneo, diseñado para transmitir las fuerzas en lugar de absorberlas. Las tensiones que actúan sobre el maxilar superior son por una parte absorbidas por el propio hueso, pero gran parte de esas fuerzas se transmiten a lo largo del arco cigomático y el paladar duro. Debido a este fenómeno, el maxilar superior cuenta con un hueso cortical delgado y un hueso trabecular fino y poco denso alrededor de los dientes (16,17).

En la literatura, la mayor parte de los autores coinciden en que el maxilar superior tiene una menor densidad que la mandíbula. La densidad de ambos maxilares se ve influenciada por el sexo, siendo las mujeres las que cuentan con unos maxilares menos densos. El hueso

maxilar, según Devlin y colaboradores, tuvo una densidad media de 1.11 g/cm^3 , $0,55 \text{ g/cm}^3$ en el maxilar anterior y $0,31 \text{ g/cm}^3$ para el maxilar posterior (18).

Turkyilmaz y colaboradores midieron la densidad ósea mediante tomografía computarizada de haz cónico y determinaron, en unidades Hounsfield, que el hueso maxilar posterior fue el menos denso de todos, mientras que la zona anterior mandibular fue la más densa ($505 \pm 274 \text{ Hu}$, $927 \pm 237 \text{ Hu}$, respectivamente)(19).

1.2.2 - Composición del hueso

El hueso como hemos visto anteriormente es un tejido vivo, compuesto por cuatro tipos de células (osteoclastos, osteoblastos, células de borde y osteocitos) y una matriz ósea extracelular.

1.2.2.1 - Matriz ósea extracelular.

La matriz ósea extracelular esta compuesta por una parte inorgánica o mineral que representa aproximadamente el 65% del peso, una componente orgánica (20 %), y agua (10%). Estos porcentajes pueden ser variables en función del tipo de hueso (20).

El componente mineral principal de la matriz ósea es la hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. También se encuentran otros minerales como ión fosfato, iones carbonato, bifosfato, fluoruro, citrato etc. La fase inorgánica tiene principalmente dos funciones:

- Proporciona al hueso gran parte de su resistencia y rigidez, sobre todo a la compresión.
- Sirve de reservorio mineral.

La parte orgánica de la matriz, por otro lado, está compuesta por colágeno tipo I, V y XII. Predomina en gran medida el colágeno tipo I, el cual constituye el 90% de la componente orgánica. El 10% restante incluye proteoglicanos y proteínas no colágenas. La parte orgánica es la encargada de dotar al hueso de flexibilidad, lo que la va a hacer responsable de la resistencia a la tracción.

Las proteínas no colágenas desempeñan un papel muy importante en la remodelación ósea. Algunas de estas proteínas son: osteopontina, factores de crecimiento, citoquinas, osteonectina, proteoglicanos etc.

El agua que contenida en el hueso esta formando parte de la médula ósea, relleno los poros de la propia matriz y unida al colágeno. Cuando el hueso está recién formado o en proceso de formación, el hueso cuenta con una gran parte de matriz orgánica junto con agua que, posteriormente, mientras madura, ira mineralizándose convirtiéndose así en hueso maduro calcificado (20).

1.2.2.2 - Osteoclastos.

Los osteoclastos son células multinucleadas derivadas de la porción hematopoyética de la medula ósea, que surgen de la diferenciación de los osteoclastos precursores. Son las células encargadas de reabsorber

el hueso. Los osteoclastos tienen un gran número de mitocondrias, necesarias para crear la energía suficiente para poder deshacer el hueso (20).

1.2.2.3 - Osteoblastos.

Son células cuboidales mononucleadas, derivadas de las células progenitoras mesenquimales, responsables de la formación de hueso. El osteoblasto cuenta con un gran retículo endoplásmico, característico de las células encargadas de la síntesis de proteínas. Se encuentran en las superficies óseas y en las áreas de crecimiento.

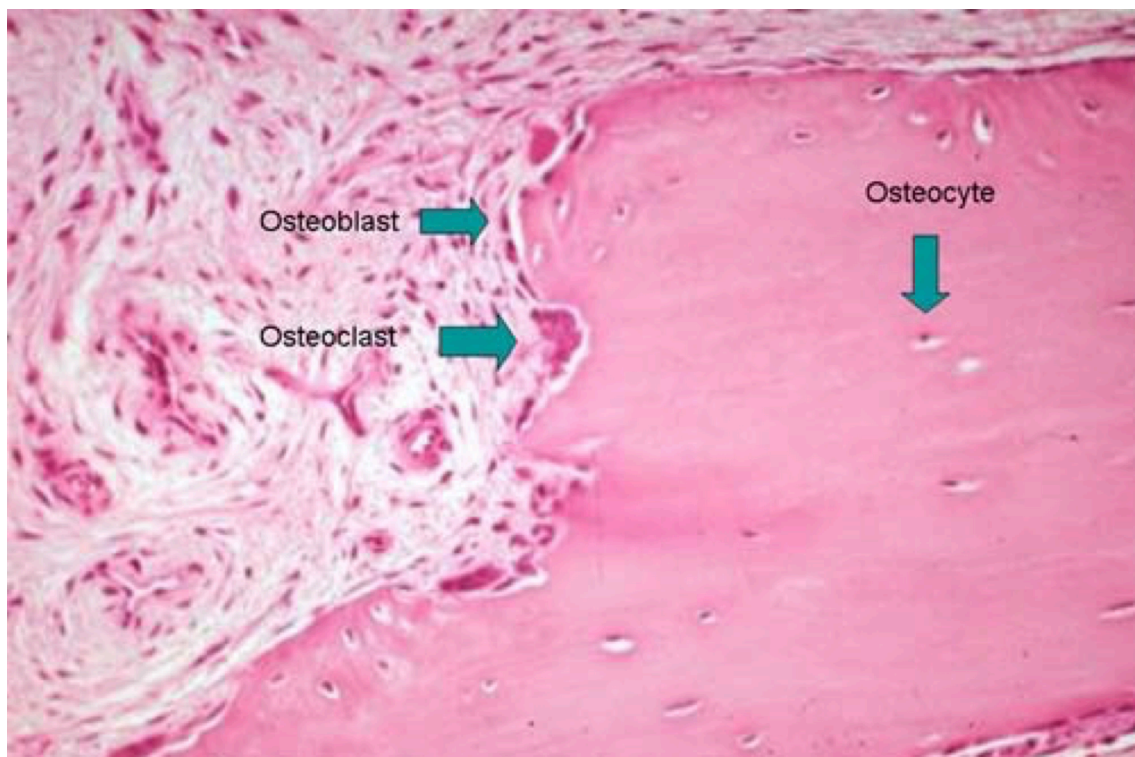


Ilustración 1. Corte histológico de las diferentes células óseas.

1.2.2.4 - Osteocito.

Es la célula principal de hueso formado. El osteocito proviene del osteoblasto, una vez ha formado hueso y se queda atrapado en la matriz osteoide neoformada. Una vez ha quedado englobado, cambia su morfología, adoptando una forma "estrellada", con prolongaciones que le van a permitir comunicarse con otros osteocitos y con las células del borde o de revestimiento, además de nutrirse.

1.2.2.5 - Células de borde o revestimiento (Linning cells).

Son células que, al igual que los osteocitos, derivan de los osteoblastos. Los osteoblastos que no quedan englobados en la matriz ósea formando los osteocitos, migran hacia la superficie ósea donde se diferencian a células de borde o células de revestimiento, cambiando su forma a una más aplanada y cubriendo toda la superficie ósea. Dichas células son las encargadas de proteger al hueso de los diferentes agentes químicos y de comunicarse con los osteocitos. Las células de borde pueden ser activadas para la nueva formación de una capa de osteoblastos (16,21).

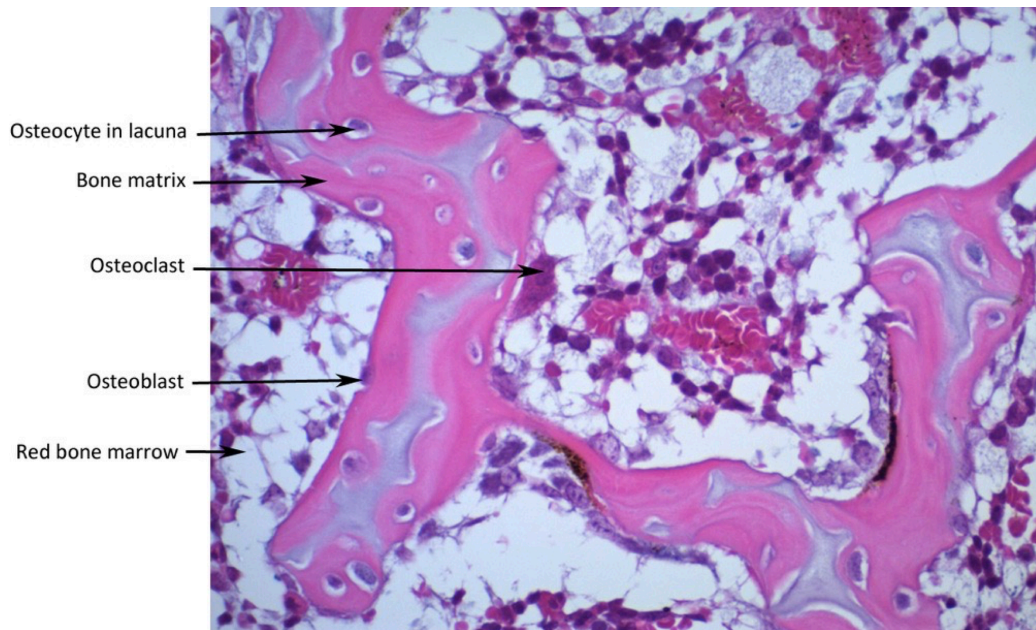


Ilustración 2. Corte histológico de las diferentes células óseas

1.2.3 - Metabolismo óseo

Los huesos no son estructuras estáticas, sino que se van modificando con el paso del tiempo. Desde antes incluso del nacimiento, los huesos comienzan su andadura, aumentando su tamaño, tanto en longitud como en diámetro, creando la forma definitiva que tendrá nuestro esqueleto. A esta primera fase de aposición ósea, Frost (22) la denominó "*modelling*" lo que se tradujo como modelado o remodelado óseo externo. Durante este modelado óseo, los huesos pueden adoptar formas diferentes y aumentar su tamaño en función del crecimiento. En adultos, en los cuales ha cesado su crecimiento, se producen microfracturas debido a la fatiga, que son reparados por el propio hueso. A este fenómeno, Frost lo denominó "*Remodelling*", lo que se

tradujo como remodelado o remodelado óseo externo (22). El remodelado óseo únicamente reparará los daños creados por el paso del tiempo, sin cambiar la anatomía del hueso reparado. Es bien sabido, que el proceso de remodelado óseo es continuo en el cuerpo, proceso mediante el cual la matriz ósea vieja es sustituida por una nueva. Aproximadamente, el 8% del tejido óseo adulto es renovado cada año. El proceso de remodelado cumple principalmente dos funciones:

- La renovación del esqueleto con el fin de evitar la pérdida de propiedades mecánicas por efecto del desgaste y las microfracturas.
- Dotar al cuerpo de los iones almacenados en el tejido óseo en función de sus necesidades.

Biomecánicamente hablando, en 1987, Frost, basándose en los estudios previos de Wolf, quien propuso que el alineamiento óseo trabecular estaba regulado por las trayectorias de las tensiones principales (23), propuso un criterio para la remodelación del hueso sobre la base de magnitud de la tensión interna. Esto quiere decir, que el hueso es capaz de soportar una determinada deformación, a partir de la cual se producirán microfracturas (24).

Más tarde, Wiskott, basándose en el mecanostato de Frost, estableció 5 categorías, una más que las indicadas por Frost y con diferentes rangos de deformación (25).

1. Desuso (mayor reabsorción ósea): Se produce con unas cargas menores, las cuales provocan una microdeformación menor de $100 \mu\epsilon$. El índice r (cantidad de ganancia ósea) es negativo por una mayor fase de reabsorción en los ciclos de remodelado.

2. Carga fisiológica normal (homeostasis ósea): En el rango $100-1.500 \mu\epsilon$. La fracción r es cero, por lo que no existe ni reabsorción ni aposición ósea.

3. Sobrecarga media (mayor aposición ósea): En el rango $1.500-4.000 \mu\epsilon$. El r es positivo, lo que quiere decir que debido a la estimulación ósea se produce ganancia.

4. Sobrecarga patológica (Daño óseo irreversible): Por encima de $4.000 \mu\epsilon$ (0,4% de deformación). Aparecen fenómenos de movilidad y grietas por fatiga.

5. Fractura: La resistencia a la flexión del hueso es aproximadamente de 120 Mpa , lo que se corresponde a una deformación de $20.000 \mu\epsilon$ (2% de deformación)

Como ya hemos explicado anteriormente, el esqueleto humano es el principal encargado de abastecer al resto del cuerpo de calcio y otros iones. Por lo tanto, existen principalmente dos vías por las cuales se activan los mecanismos de reabsorción y aposición ósea. Por un lado, la necesidad de adaptación del esqueleto a la carga generada por el día a día y el abastecimiento de minerales, sobre todo del Calcio.

La regulación del calcio es un proceso homeostático en el que el sistema hormonal también juega un papel muy importante. Si la concentración de calcio en sangre disminuye, las glándulas paratiroides segregan PTH, una hormona que estimula la actividad de los osteoclastos, lo que acelera la reabsorción ósea, pasando el calcio de la matriz extracelular a la sangre. Por el contrario, si la concentración de calcio sanguíneo es muy alta, las células C de la glándula tiroides segregan calcitonina que inhibe la actividad de los osteoclastos.

Un grupo de células óseas, llamadas BMU (*"Basic Multicellular Unit"*), que están compuestas por osteoclastos y osteoblastos, son las encargadas de realizar el procesos de absorción y aposición ósea (26,27).

Las BMU's actúa de forma coordinada, de modo que mientras en una zona, los osteoclastos están reabsorbiendo el hueso, en otra zona, son los osteoblastos los encargados de aposicionar nuevo tejido osteoide. Dentro de la BMU, la actividad de los osteoclastos precede siempre a la de los osteoblastos en una secuencia invariable de activación-reabsorción-formación, denominada como "*secuencia ARF*"[260], en la cual es esencial la comunicación intercelular. El proceso completo de la secuencia ARF incluye seis fases, que son: activación, reabsorción, inversión, formación, mineralización, fin de la adaptación.

Activación.

Como ya hemos explicado anteriormente, los osteocitos son extremadamente sensibles. En el momento que se genere una señal química o mecánica necesaria, éstos emitirán una señal, que mediante los canalículos y las lagunas del entramado óseo, trasportarán la información necesaria para que las células de revestimiento o "*lining cells*" (28), situadas en la superficie ósea, comiencen con el proceso de reabsorción (29).

Reabsorción.

En este momento, las células de revestimiento modifican su forma, volviéndose más aplanadas y separándose de la superficie ósea para dejar hueco a los osteoclastos. También son las encargadas de secretar RANKL (ligando RANK), proteína que activa al receptor RANK (receptor activador del factor nuclear kappa β) en los preosteoclastos. La interacción entre RANK y RANKL permite la diferenciación y maduración de osteoclastos activos capaces de reabsorber el tejido óseo (30). El proceso de maduración de los osteoclastos también se puede ver afectado por la Osteoprotegerina (OPG), sustancia que segregan los osteoblastos para impedir la unión del ligando RANK (RANKL) con el RANK, inhibiendo así la maduración de los osteoclastos (31,32)

Los osteoclastos maduros se unen a la superficie ósea a través de integrinas, creando unas prolongaciones llamadas "*ruffled border*". En este momento los osteoclastos crean un ambiente ácido (pH 4), secretando iones H^+ hacia el hueso, que disolverá la parte mineral. Una vez disuelta, producirán enzimas (metaloproteinasas y catepsinas K, B y L) que degradarán la matriz orgánica, creando unos huecos denominados "Lagunas de Howship" (33). Una vez finalizado el proceso de reabsorción, los osteoclastos comienzan la muerte celular programada o apoptosis.

Inversión.

La inversión es el proceso de transición entre el fin de la actividad de los osteoclastos y el inicio de los osteoblastos. Aparentemente es una fase de inactividad. Dura aproximadamente 30 días y es el momento en el que poco a poco se va preparando la superficie para que se inicie la actividad osteoblástica (34).

Formación ósea.

El proceso de formación ósea comienza cuando los osteoblastos depositan las primeras láminas de osteoide sobre la superficie que han reabsorbido los osteoclastos. Los osteoblastos maduros comienzan a generar tejido osteoide, mediante la secreción de elementos como colágeno tipo I y diferentes tipos de proteínas. Posteriormente, se

producen cambios fisicoquímicos que comienzan con el proceso de mineralización (35).

Mineralización

Entre 10 y 20 días después de la aposición del osteoide comienza la mineralización. Se van a diferenciar dos fases; una fase primaria, muy rápida, que ocurre en el transcurso de unos pocos días, durante la cual se consigue alcanzar alrededor de un 70% de la mineralización total (36), y una segunda fase, mucho más lenta en la que se acaba consiguiendo hasta el 95% del contenido mineral. Esta fase dura entre 6 meses y varios años (36,37).

Fin de la adaptación.

Los osteoclastos sufren apoptosis y la BMU's se detienen. Durante un tiempo seguirán actuando los osteoblastos generando nuevo osteoide y rellenando los huecos que dejaron los osteoclastos. Dentro de la matriz quedan atrapados algunos osteoblastos, que se diferencian hacia osteocitos (aquellos que hayan quedado atrapados dentro de la matriz) o a células de revestimiento o "*lining cells*" (aquellos que hayan quedado en la superficie ósea). Los osteoblastos que no son diferenciados hacia ninguna de estas otras células sufrirán muerte celular programada o apoptosis. Ahora solo queda esperar una maduración progresiva del nuevo hueso formado y esperar a comenzar

de nuevo el proceso cuando así lo requieran las necesidades biológicas (36).

1.3 - Clasificación ósea.

La cantidad de hueso del que los pacientes disponen tiene una importancia especial en odontología, y va a condicionar tanto la arquitectura y volumen de la zona edéntula como el plan de tratamiento. En los inicios de la odontología, la cantidad de hueso condicionaba directamente la colocación de implantes; si había poco hueso se colocaban menos implantes y más cortos (38). Este tipo de planificaciones provocaban, en muchos casos, resultados antiestéticos, problemas en la masticación, problemas con la prótesis etc... En la actualidad, el diseño prostodóncico, precede a la planificación de la cirugía de implantes. Primero se debe conocer que tipo de prótesis necesita el paciente, para después planificar la cirugía. En el caso de que las condiciones óseas no sean las ideales, gracias a los avances en cirugía regenerativa tanto ósea como de tejidos blandos, permitirán conformar una nueva arquitectura tisular óptima para alojar nuestros implantes y nuestra prótesis.

Existen en la literatura múltiples clasificaciones óseas en función de su densidad, forma, etc.

1.3.1 - Clasificación ósea en función de la densidad.

En la mayor parte de las ocasiones, la calidad del hueso dependerá de la posición de la arcada en la que nos encontremos. El hueso más denso suele encontrarse en la zona anterior mandibular, seguido por la zona anterior del maxilar superior, zona posterior de la mandíbula, y por último zona posterior del maxilar superior (18,39,40).

En cuanto al éxito de los implantes en función de la densidad del lecho donde son colocados, existe mucha literatura. Como ya hemos mencionado anteriormente, una buena estabilidad primaria va a ser clave para la osteointegración. Muchos de los artículos estudiados, refieren una mayor pérdida, tanto de hueso marginal periimplantario, como de osteointegración, en los implantes colocados en huesos tipo IV (41-45). Estos autores, achacan el peor comportamiento de los implantes frente a huesos blandos (tipo IV), a una falta de estabilidad primaria. En estudios más actuales, nos encontramos con algunas diferencias, ya que Ibañez y colaboradores, en un estudio retrospectivo, en el que se incluían 558 implantes, colocados en 172 pacientes, concluyó que, después de un seguimiento de $9,32 \pm 4,09$ años, los implantes colocados en huesos tipo IV tenían una menor pérdida ósea marginal que los implantes colocados en huesos más duros (tipo II y I) (46). Simons y colaboradores estudian la proporción de hueso trabecular en la pérdida ósea marginal periimplantaria. Concluyen que huesos con un mayor porcentaje de tejido óseo

trabecular tienen una menor pérdida ósea temprana que los implantes colocados en huesos más densos (47).

También en un estudio publicado por Derks y colaboradores en 2016, con un periodo de seguimiento medio de 9 años observaron que la prevalencia de periimplantitis es mayor en mandíbula que en maxilar (2:1)(48) .

Este estudio coincide con lo publicado por Lindquist, donde estudiaron 273 implantes, colocados en 47 pacientes, con un seguimiento de 15 años y concluyeron que los implantes alojados en las zonas posteriores, sobre todo maxilar, tenían una menor pérdida ósea que los colocados en las zonas anteriores (49).

Por lo tanto, existen autores que observan un peor comportamiento de los huesos más densos mientras que otros muchos autores concluyen que los huesos menos corticalizados preservan de manera más eficiente el hueso marginal periimplantario.

Son necesarios más estudios y a más largo plazo para poder discernir que tipo de hueso se comporta mejor, pero lo que si sabemos hoy en día es que el hueso cortical:

- Presenta una menor vascularización que puede perjudicar la presencia de células osteoprogenitoras y la densidad celular osteoblástica crítica necesaria para la reparación ósea (50).

- El hueso cortical esta mucho más expuesto que el trabecular y además es mucho más sensible a la mecanostraducción (51).

Por lo tanto, es de vital importancia conocer la densidad del hueso donde se coloquen nuestros implantes, ya que necesitamos unos valores adecuados de estabilidad primaria para conseguir un buen pronóstico del tratamiento.

Desde hace más de 50 años, ya se conoce la importancia de la densidad ósea. En 1970 Linkow (52) ya clasificó el hueso en tres categorías en función de su densidad:

- **Estructura ósea de clase I:** este tipo de hueso esta conformado por trabéculas dispuestas regularmente con pequeños espacios entre sí.
- **Estructura ósea de clase II:** El patrón óseo es menos uniforme y existen espacios enrejados ligeramente mayores.
- **Estructura ósea de clase III:** Existen grandes espacios llenos de médula entre las trabéculas.

Linkow aseguraba que el hueso ideal para la colocación de implantes era el tipo I, y que la estructura ósea tipo III conseguía un ajuste muy laxo de los implantes, por lo que el pronóstico empeoraba (52).

Más tarde, en 1985, Leckholm y Zarb identificaron cuatro calidades óseas en la región mandibular anterior (53):

- **Hueso tipo I:** Presenta una gran tabla cortical con muy poca parte trabecular en su interior. La zona donde más se da esta situación es en la zona anterior de la mandibular.
- **Hueso tipo II:** Presenta una cortical un poco más fina, dejando algo mas de espacio para la fase trabecular ósea. Este tipo de hueso se puede encontrar en la zona posterior de la mandíbula y zona anterior maxilar.
- **Hueso tipo III:** La fase cortical de este tipo es muy fina y el hueso trabecular cuenta con una densidad alta y favorable. Este hueso suele encontrarse en el maxilar, tanto en zona anterior como posterior.
- **Hueso tipo IV:** Este tipo de hueso cuenta con una cortical muy fina rodeando un hueso trabecular muy poco denso. Suele darse en algunas ocasiones en la parte posterior del maxilar.

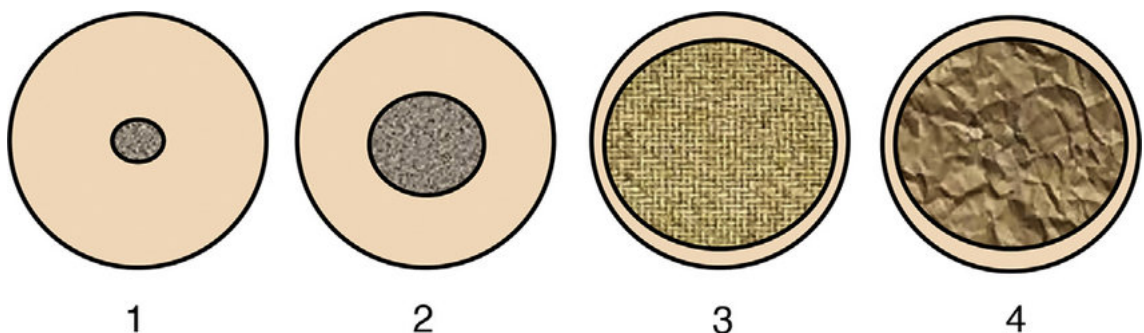


Ilustración 3. Clasificación densidad ósea descrita por Leckholm y Zarb (1985).

Años después, Misch propuso cuatro grupos de densidad ósea, basados únicamente en las características macroscópicas de hueso cortical y trabecular (54). Misch definió las cuatro categorías de densidad ósea y les asignó un nombre, a saber; D1, D2, D3 y D4.

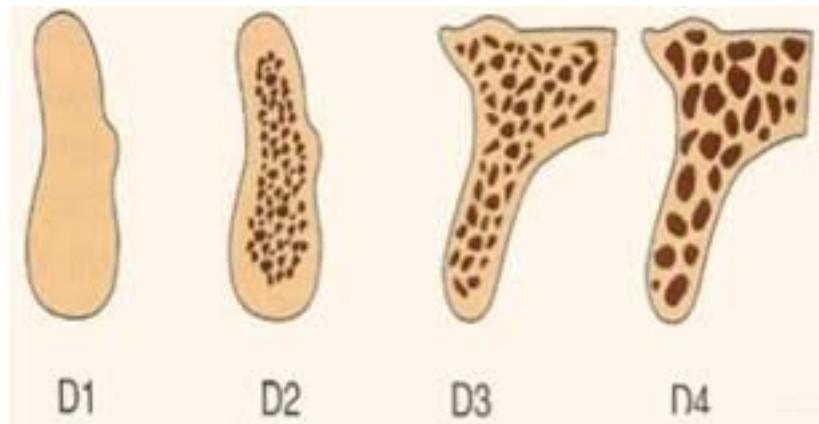


Ilustración 4. Clasificación densidad ósea descrita por Carl E. Misch

El hueso D1 es un hueso fundamentalmente cortical denso. Suele localizarse en la región anterior de la mandíbula. El hueso D2 está formado por hueso cortical poroso y hueso trabecular denso. La localización más frecuente es región anterior del maxilar inferior y superior y región posterior del maxilar inferior. El tipo D3 cuenta con una cortical porosa y fina y una parte trabecular fina. Suele localizarse con más frecuencia en el maxilar superior y en la zona posterior del maxilar inferior. El hueso tipo D4 apenas presenta hueso cortical y el hueso trabecular es muy poco denso. Suele localizarse en la región posterior del maxilar superior. Misch, además de estas cuatro categorías, añade una quinta, para definir aquel hueso muy blando, con una mineralización incompleta, y grandes espacios

intratrabeculares. Suele ser el caso de hueso injertado en proceso de mineralización.

Misch compara las densidades óseas con tipos de maderas en cuanto a la sensación de fresado que tiene el operador, como se puede apreciar en la tabla siguiente:

Densidad ósea	Descripción	Análogo táctil	Localización característica
D1	Cortical denso	Madera de roble o arce	Región anterior maxilar superior
D2	Cortical poroso y trabecular grueso	Madera de pino blanco o de píceas	Región anterior maxilar inferior Región posterior maxilar inferior Región anterior maxilar superior
D3	Cortical poroso (fino) y trabecular fino	Madera de balsa	Región posterior maxilar superior Región posterior maxilar inferior Región anterior maxilar superior
D4	Trabecular fino	Corcho sintético	Región posterior maxilar superior

Tabla 1. Clasificación ósea descrita por Carl E. Misch

1.3.1.1 - ¿Cómo identificamos la densidad ósea del paciente?

Haciendo un breve repaso de la literatura, muchos autores afirman que el éxito de nuestros implantes va a depender de la calidad del hueso donde se coloquen. Por ese motivo, es de suma importancia conocer la calidad ósea del paciente, y así planificar de la manera más efectiva la colocación del implante (41-46,49).

La densidad ósea puede determinarse de las siguientes formas:

- Basándose en la localización general donde se coloque el implante.
- La sensación al tacto durante la cirugía.
- Mediante radiografía computarizada.

1 - Localización general.

Como ya hemos visto anteriormente, tanto Leckholm y Zarb como Misch en sus clasificaciones, relacionaron las diferentes localizaciones de la arcada maxilar y mandibular con una determinada calidad ósea. Además, muchos autores han corroborado las diferentes densidades en función de la posición en la arcada (41,54).

2 - Sensación al tacto durante la cirugía.

Al preparar el lecho para alojar el implante, se aprecian grandes diferencias en función de la densidad ósea.

Existe una relación directa entre la densidad del hueso y la resistencia que ofrece el mismo a la osteotomía (55). Además, Misch hace una comparación de la sensación táctil de cada tipo de densidad, comparándola con diferentes maderas.

3 - Densidad radiográfica.

Tanto las radiografías periapicales como las panorámicas no son demasiado útiles para determinar la densidad ósea, ya que no permiten, en muchas ocasiones, ver el hueso trabecular. En cambio, con el Cone Beam Computed Tomography (CBCT), se puede determinar con mayor exactitud tanto la densidad ósea como las características tridimensionales del hueso. La tomografía computarizada fue desarrollada por Sir Godfrey Newbold Hounsfield en el siglo pasado, lo que le condujo a ganar el premio Nobel en 1979. El CBCT nos permite determinar, por medio de una escala de grises, pudiendo diferenciar hasta 256 grados de grises diferentes, de forma objetiva y cuantitativa, la densidad de las estructuras y tejidos. Esta escala está representada por las Unidades Hounsfield, siendo la unidad elemental de reconstrucción 3D. Las Unidades Hounsfield (UH), llamadas así en honor al creador del primer tomógrafo computarizado, Godfrey Newbold Hounsfield, expresan numéricamente la atenuación en la intensidad que experimenta el haz de rayos, desde que sale del aparato, hasta que llega a sus detectores en el lado contrario.

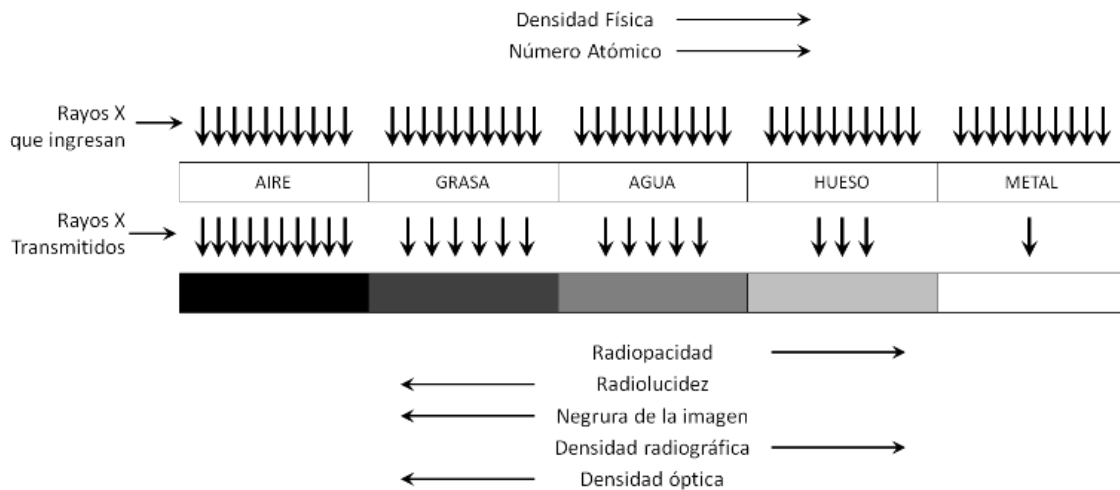


Ilustración 5. Clasificación de la densidad ósea radiográfica en función de la escala de grises.

El vóxel (del inglés volumetric píxel) es la unidad cúbica que compone un objeto tridimensional. Constituye la unidad mínima procesable de una matriz tridimensional y es, por tanto, el equivalente del píxel en un objeto 2D.

Cada voxel contiene la información necesaria para determinar la densidad de la imagen. Estos valores se expresan en UH.

Aunque no hay una cifra exacta en UH que se puede atribuir a un tipo particular de material, existe un intervalo de valores dentro de la cual se esperaría encontrar un cierto tipo de material (56).

Las UH se representan en escala de grises, a nivel tejidos los valores van generalmente desde: -1000 a +1000. De este modo se puede clasificar a los tejidos según su coeficiente de atenuación: Agua (0), Tejidos blandos (+40 a +80), Grasa (-60 a -100), Pulmón (-400 a -600), Hueso (>+400) etc...

Los tejidos más densos, como los huesos, absorben mayor cantidad de rayos por ese motivo tienen un coeficiente de atenuación elevado en la escala Hounsfield. En cambio, los órganos poco densos como los pulmones son atravesados fácilmente por los rayos porque su coeficiente de atenuación es muy bajo.

Para elaborar esta escala, Hounsfield tomó como referencia la atenuación que producía el agua sobre un haz de rayos y se le atribuyó el valor 0 (cero UH). Esta medida serviría como referencia para calcular todos los demás coeficientes. Posteriormente midió la atenuación del hueso compacto cortical al que adjudicó mil unidades positivas (+1000UH), porque era el tejido más denso y los minerales que contiene tienen una gran capacidad de absorción de los rayos X.

Recientemente, los aparatos modernos han aumentado las cifras del coeficiente de atenuación hasta (+4096) que se obtiene al medir la densidad de algunos metales.

Kirkos y Misch, en 1999, realizaron un estudio retrospectivo de tomografías computarizadas y establecieron una correlación entre las unidades Hounsfield y las densidades óseas propuestas por el propio Misch (57).

Densidad ósea	Unidades Hounsfield
D1	>1250 Unidades Hounsfield
D2	850-1250 Unidades Hounsfield
D3	350-850 Unidades Hounsfield
D4	150-350 Unidades Hounsfield
D5	< 150 Unidades Hounsfield

Tabla 2. Determinación de la densidad ósea mediante tomografía computarizada.

Dos años después, en 2001, los autores Norton y Gamble, publicaron una clasificación cuantitativa de la calidad ósea, con el fin de poder establecer la densidad del tejido óseo preoperatoriamente. Esto permitiría una mejor planificación del tratamiento. Relacionaron las unidades Hounsfield con la clasificación de la densidad ósea descrita por Leckholm y Zarb en 1985 (58).

Clasificación Leckholm y Zarb	Unidades Hounsfield (Norton y Gamble)	Región de interés
Tipo 1	>850HU	Mandibula anterior
Tipo 2	500-850HU.	Mandibula posterior/maxilar anterior
Tipo 3	500-850HU	Maxilar posterior
Tipo 4	0-500HU	Tuberosidad

Tabla 3. Comparación de la densidad ósea.

1.3.2 - Clasificación ósea según la anatomía del reborde.

Existen muchas clasificaciones diferentes en cuanto a la disponibilidad de hueso remanente. La más utilizada por los clínicos y los anatomistas es la descrita por Cawood y Howell en el año 1988.

Esta clasificación, a pesar de destacar que cada uno de los individuos puede poseer características de reabsorción diferentes, se basa en dos aspectos fundamentales:

- I. Rebordes alveolares dentados, con la anatomía perfectamente conservada.
- II. Cresta alveolar post extracción.
- III. Reborde alveolar con adecuada altura y anchura.

- IV. Crestas en filo de cuchillo, con adecuada altura, pero insuficiente anchura.
- V. Reborde con inadecuada altura y anchura.
- VI. Presencia de depresiones en los rebordes.

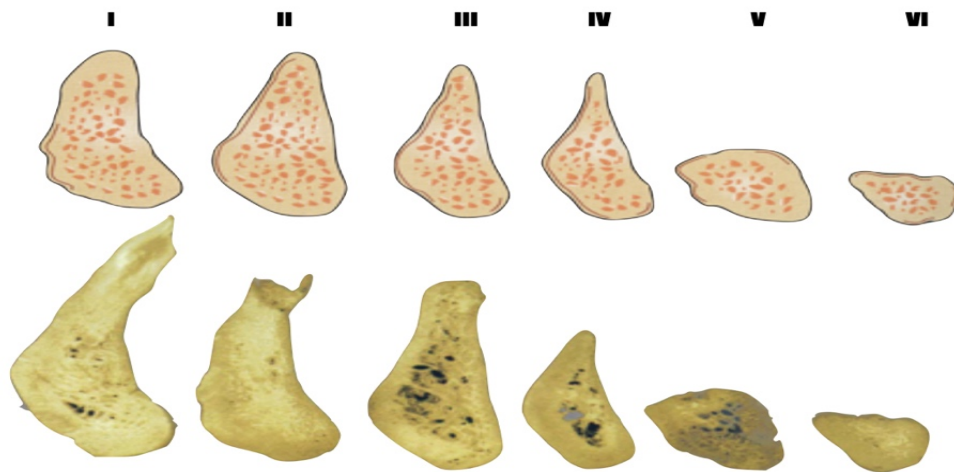


Ilustración 6. Clasificación Cawood y Howell (1988)

1.4 - Estabilidad primaria.

Anteriormente, se ha hecho mucho hincapié en la necesidad de conseguir una buena estabilidad primaria, con el objetivo de que el implante se mantenga inmóvil (con un micromovimiento menor de 150 micrómetros). Esto mejorará sustancialmente el pronóstico de la osteointegración. Pero ¿qué es la estabilidad primaria?

La estabilidad primaria se define como la ausencia de movilidad clínica cuando el implante es sometido a alguna carga, y es considerado como

uno de los principales factores de éxito (3,59). La estabilidad primaria es un parámetro puramente mecánico y estático, con un valor determinado en el momento de la colocación del implante. A diferencia de la estabilidad primaria, la estabilidad secundaria es el resultado de los procesos fisiológicos de aposición y remodelación ósea en la superficie del implante, lo que conduce a la osteointegración. Por lo tanto, es un parámetro biológico y dinámico (60–63)

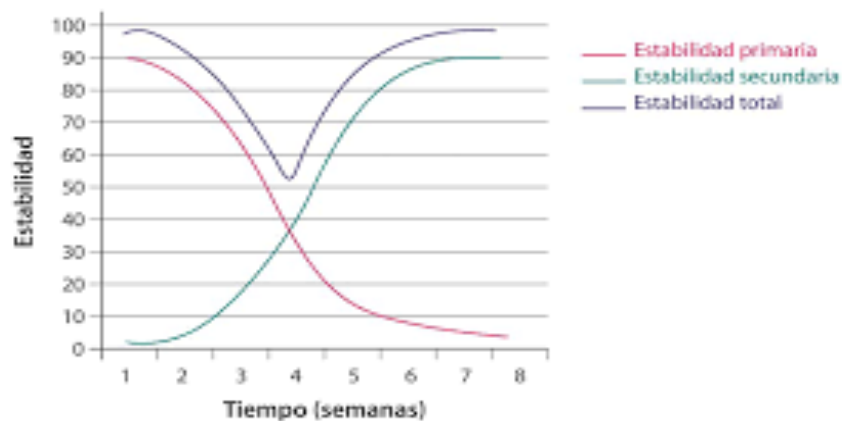


Ilustración 7. Relación estabilidad primaria y secundaria con respecto al tiempo.

1.4.1 - ¿Cómo medimos la estabilidad primaria?

Para medir la estabilidad primaria de los implantes contamos con varios métodos. Meredith, en 1988 publicó una clasificación en función de si afectan o no a la interfase implante-hueso; métodos invasivos y métodos no invasivos (64).

- Métodos invasivos.

Los métodos invasivos para la medición de la estabilidad primaria son aquellos que van a suponer la retirada o modificación de la posición del propio implante. Por un lado, tenemos las pruebas histológicas que van a determinar la cantidad de hueso que hay alrededor del implante. Por otro lado, también existe la prueba del torque de desinserción, que se define como la fuerza de torsión necesaria para romper la unión implante hueso. Obviamente, por motivos éticos, estas pruebas no pueden realizarse en humanos, ya que conllevaría la retirada o la pérdida de osteointegración del implante.

Por ello, existe la necesidad de poder medir la estabilidad periimplantaria sin dañar la interfase hueso-implante.

- Métodos no invasivos.

Los métodos no invasivos no van a dañar ni perjudicar la osteointegración del implante. Hoy en día se podría incluir en este

apartado varios métodos, aunque no todos tienen el mismo nivel de efectividad.

Vamos a ver detalladamente cada uno de ellos:

1 - Test de percusión.

El test de percusión consiste en golpear con un instrumento metálico la cabeza del implante. En función de la naturaleza del sonido que genere el golpe, podríamos intuir el nivel de integración del implante. Este método no es muy fiable, pues se basa en criterios subjetivos ya que el oído humano no es capaz de distinguir la amplitud del tono producido, o al menos no todos los humanos por igual.

2 - Método Periotest[®].

El instrumento Periotest[®] (Siemens Medical Systems Inc, Charlotte, Nc) fue diseñado por Schulte y cols (65), en 1983 con la finalidad de medir la movilidad dentaria. El Periotest[®] fue diseñado para medir la movilidad dentaria, no de implantes. El aparato consiste en una bola percutora metálica que genera una secuencia de 16 golpes (4 golpes por segundo), valorando, tanto acústica como ópticamente, la capacidad de amortiguación del ligamento periodontal. El aparato nos indica la movilidad en forma de un valor Periotest[®] (vpt). El valor se establece en una escala de -8 a +50, de modo que un valor negativo

indica contacto con una interfase dura, es decir ausencia de movilidad (ej. osteointegración) y uno positivo con una interfase blanda (66).

Chávez y colaboradores cuantificaron el desplazamiento en mm que suponía diferentes valores Periotest. Para valores de -6 vpt, el desplazamiento sería de 0,038 mm, mientras que para un valor de 2 vpt le correspondería una movilidad de 0,113 mm (67,68).

Artículos publicados sugieren que valores vpt negativos corresponden a dientes o implantes anquilosados, mientras que valores por encima de +5vpt corresponderían con implantes no integrados. Estos valores también van a depender del sistema de implantes y de la calidad del tejido óseo donde los coloquemos. Teerlinck y colaboradores establecieron un valor vpt de implantes osteointegrados entre -7 a +5 en mandíbula y entre -5 y +9 en maxilar superior (67).

El principal inconveniente que nos encontramos con este método de medición, es que los valores Periotest[®] se pueden ver alterados por distintos factores como: la técnica de medición, el tipo de prótesis realizada (67), la interposición de hueso o tejido blando entre el pilar y el implante, la fuerza con la que se apriete la prótesis y factores dependientes directamente del instrumento como la batería o la calibración (69).

También se ha estudiado la relación real de los valores Periotest[®] y la osteointegración de los implantes. Diferentes autores han llegado a la

conclusión que los valores Periotest[®] te dan una idea de la estabilidad del implante, pero no son capaces de mostrar una relación directa en el contacto hueso-implante (66,70-73).

3 - Torque de inserción.

El torque de inserción se define como la resistencia a la rotación que genera el implante al introducirse en el hueso. Se expresa en Newtons/cm². Diferentes autores han relacionado los valores del torque de inserción con el micromovimiento del implante, concluyendo, que cuanto mayor es el torque de inserción del implante, menor es el micromovimiento del mismo (74,75). Por lo tanto, los valores del torque de inserción van a estar relacionados con la estabilidad implantaria. El torque de inserción se puede medir únicamente en el momento de la colocación del implante, y los valores ideales oscilan entre los 25 y los 45 N/cm². Según Ottoni y colaboradores, el torque ideal para la osteointegración del implante es de 32 N/cm² (76). Un valor alto de torque de inserción podría aumentar patológicamente la presión del hueso en contacto con el implante provocando microfracturas y posible necrosis ósea, lo que conllevaría a una pérdida marginal periimplantaria. Duyck y colaboradores demostraron mediante radiografía histomorfometría e histología, que los implantes colocados con un torque de inserción mayor de 50 N/cm² tenían una mayor pérdida ósea marginal que aquellos colocados de forma más pasiva (77). Cha y colaboradores, concluyeron que el incremento del

torque de inserción podría duplicar la capa de osteocitos muertos en comparación con torque de inserción menor (78). Barone y colaboradores concluyeron que, de igual manera, cuando se aplica un torque de inserción superior a los 50 N/cm², existe una mayor propensión a una pérdida ósea marginal periimplantaria, sobre todo en presencia de una cortical vestibular muy delgada (79). Cuando comparan valores más altos de torque de inserción (>70 N/cm²), se pudo evidenciar que la pérdida ósea marginal era sustancialmente mayor (80). Todos estos autores concluyen que torques de inserción elevados provocarán una pérdida de hueso marginal periimplantario. Al contrario, ¿qué ocurre con valores de torque de inserción menores?, Norton publicó en 2017 un estudio prospectivo en el que relacionaba el torque de inserción y los valores ISQ. Los implantes colocados con torque menor a 5 N/cm² fueron los que consiguieron valores ISQ mas altos tras el periodo de osteointegración (81). Esto coincide con los resultados obtenidos por otros autores (82,83).

4 - Análisis de frecuencia resonancia.

Se denomina frecuencia de resonancia a aquella frecuencia característica de un cuerpo o un sistema que alcanza el grado máximo de oscilación.

Todo cuerpo o sistema tiene una, o varias, frecuencias características. Cuando un sistema es excitado a una de sus frecuencias características, su vibración es la máxima posible. El aumento de

vibración se produce porque a estas frecuencias el sistema entra en resonancia.

Por lo tanto, el análisis de frecuencia resonancia evalúa la movilidad del implante mediante la frecuencia de vibración de este.

Fue Meredith, en 1994 (64), quien describió este método para valorar la unión implante-hueso. El método consiste en la unión de un transductor atornillado al implante mediante una interfase de medidas estándar (multipeg[®], smartpeg[®]). Un aparato (Osstell[®], Penguin[®]), emite una serie de ondas con una frecuencia de resonancia determinada que el transductor recibirá. En el momento que la onda coincide con la frecuencia natural de vibración del transductor unido al implante, este vibrará y el aparato recibirá esa vibración como la frecuencia natural de vibración de ese implante en ese momento. El valor obtenido por el aparato se traduce automáticamente en un índice llamado "*Implant Stability Quotient*" (unidades ISQ). En una escala de 1 a 100, el aparato mostrará cuanto se mueve ese implante. Cuanto mayor sea la unión entre el implante y el hueso, mayor será su frecuencia natural de vibración y por lo tanto mayores valores ISQ nos mostrará el aparato.

El análisis de frecuencia resonancia, permite una medición objetiva del grado de osteointegración de los implantes. Además, al contrario que el torque de inserción, esta medida se puede obtener en diferentes

momentos, por lo que es posible monitorizar la osteointegración de los implantes (84–86).

Para realizar la medición tenemos que atornillar el transductor al implante con una fuerza de 10 N/cm². Una vez atornillado, se posiciona el aparato perpendicular al transductor. Permite medir la estabilidad implantaria en varios sentidos, como por ejemplo, en sentido mesiodistal y vestíbulo-lingual (84).

Los valores ISQ son utilizados por los clínicos para determinar cuando se puede cargar un implante con seguridad, tanto de forma convencional o diferida como de forma inmediata. Según la literatura, valores por encima de 70 ISQ se relacionan con una buena estabilidad implantaria (87–89), lo que permitiría cargar los implantes.

Se ha demostrado una relación directa entre los valores ISQ y el micromovimiento de los implantes. En el estudio de Brizuela-Velasco y colaboradores, demostraron que cuanto mayores eran los valores ISQ, menor era el micromovimiento de los implantes sometidos a carga (74). Los resultados de su artículo coincidía con otros autores, que mostraron la misma relación entre los valores ISQ y torque de inserción con el micromovimiento (75,90).

Una vez descritos ambos métodos, ¿cuál es el mejor método para medir la integración de los implantes dentales, el torque de inserción o el análisis de frecuencia resonancia? Anteriormente hemos descrito

que los valores del torque de inserción, independiente de ser muy bajos, no tienen porque jugar un papel determinante en la osteointegración (81–83). Al contrario pasa con valores altos de torque de inserción, pues según algunos autores, por encima de los 50 N/cm² se puede exceder la tensión máxima que soporta el hueso e inducir en él la necrosis (77–80). Por lo tanto, parece que el torque de inserción no es un método fiable para medir la estabilidad periimplantaria, aunque sea un recurso altamente demandado por los clínicos en el momento de la cirugía. En cambio, el análisis de frecuencia resonancia parece tener una mayor relación con la estabilidad real del implante, pues mide la vibración en sentido axial y no la resistencia vertical al roscar el implante al hueso.

1.4.2 - Factores que modifican la estabilidad primaria

La estabilidad primaria que consigamos a la hora de colocar los implantes va a depender de muchos factores:

- Factores dependientes del paciente.
- Factores dependientes del implante.
- Factores dependientes de la técnica quirúrgica.

1.4.2.1 - Factores dependientes del paciente

En cuanto a los factores dependientes del paciente ya hemos hablado en el capítulo anterior. La calidad y cantidad del hueso que presenta el

paciente va a ser determinante en la estabilidad que consigan los implantes.

1.4.2.2 - Factores que dependen del implante

Desde que se introdujeron los implantes dentales, muchos materiales, diseños, formas han sido estudiados con el fin de encontrar el mejor implante posible. Dentro de esta categoría se distinguen tres apartados que debemos explicar con detenimiento.

1.4.2.2.1 - Material del implante

Uno de los grandes retos de las disciplinas sanitarias ha sido el de mejorar los perfiles de biocompatibilidad de las sustancias sintéticas con el fin de reponer o aumentar los tejidos biológicos. En las últimas décadas, han sido muchas las definiciones propuestas de biocompatibilidad. En general, es definida como una respuesta adecuada a un material de un dispositivo para una aplicación clínica específica.

Todo material posee una serie de características, que le confieren una propiedades físicas y químicas determinadas.

Los materiales utilizados para la fabricación de los implantes dentales deben presentar una buena resistencia a la corrosión, y poseer unas condiciones físicas determinadas, que permitan al dispositivo

(implante) cumplir su función a largo plazo sin degradarse ninguna de sus propiedades.

Por lo tanto, debido a sus excelentes propiedades, el titanio y sus aleaciones son el material de elección para la fabricación de los implantes dentales, ya que cumple con los requerimientos necesarios como: Biocompatibilidad, osteointegración, propiedades mecánicas, biofuncionalidad, resistencia a la corrosión, procesabilidad y disponibilidad (91). Las aleaciones más utilizadas son: Cromo y cobalto, aceros austeníticos de Fe-Cr-Ni-Mo, las aleaciones de tantalio, niobio y circonio, los metales preciosos, la cerámica y los polímeros (57).

Las normas internacionales (ISO 5832-2, ASTM F67-00) determinan 4 grados de titanio c.p (comercialmente puro) para su aplicación médica. A medida que aumenta el grado, aumentan la cantidad de elementos intersticiales y, con ello, aumenta la resistencia mecánica y disminuye la ductibilidad y la resistencia a la corrosión (92).

Elemento	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Nitrógeno. Máx	0,03	0,03	0,05	0,05
Carbono. Máx	0,10	0,10	0,10	0,10
Hidrógeno. Máx	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125
Hierro. Máx	0,2	0,3	0,3	0,5
Oxígeno. Máx	0,18	0,25	0,35	0,4
Titanio. Máx	Balance	Balance	Balance	Balance

Tabla 4. Composiciones químicas de los diferentes grados de titanio comercialmente puro en porcentaje en peso.

Además, las propiedades del titanio c.p, tales como la elasticidad, la resistencia a la tracción y la resistencia a la fatiga, son un claro valor añadido a la calidad superficial del metal.

Grado	Resistencia máxima (MPa)	Límite elástico 0,2% (MPa)	Alargamiento (%)	Reduccion de área (%)
1	240	170	24	30
2	345	275	20	30
3	450	380	18	30
4	550	483	15	25

Tabla 5. Propiedades mecánicas de los diferentes grados de titanio c.p.

En un principio, se utilizaron implantes de titanio comercialmente puro pero debido a sus limitadas propiedades mecánicas, como un relativo menor módulo de elasticidad y resistencia a la tracción y mayor corrosión que utilizado en aleación, se comenzó a utilizar el titanio combinado con otros materiales como el vanadio y aluminio, lo que aumentaba su módulo elástico y su resistencia a la tracción, mientras que disminuía su corrosión. La aleación Ti-6Al-4V es la más utilizada en la fabricación de implantes dentales, pero en la actualidad se están desarrollando nuevas aleaciones más biomiméticas con la finalidad de que sean más biocompatibles y permitan asegurar un correcto funcionamiento en el cuerpo humano (93). Las aleaciones más investigadas son: Ti-6Al-4V, Ti-15Zr, Ti-Nb, Ti-Hf o Ti-Ta.

	Límite elástico (Mpa)
Titanio c.p.	310
Ti6Al4V	680
Ti15Zr	953

Tabla 6. Límite elástico de las tres aleaciones más utilizadas en implantes dentales.

Todas estas aleaciones presentan un módulo de Young significativamente alto, cuando se les compara con el del hueso, incluso el cortical. En comparación con el módulo de Young del hueso

cortical, que es de 15GPa, y su coeficiente de Poisson que es de 0.30, el módulo de Young de la aleación Ti-6Al-4V es de 110GPa y de la Y-TZP de 210GPa, mientras que sus coeficientes de Poisson son 0.35 y 0.31 respectivamente (94-96). Por ese motivo, en la actualidad, existe una tendencia al desarrollo de nuevas aleaciones con propiedades elásticas más similares al hueso prístino (97), con un mayor biomimetismo y biocompatibilidad. Entre ellas destacan las aleaciones hiperelásticas, como la Titanio-Niobio-Zirconio (Ti-Nb-Zr), que además del titanio y el zirconio añaden metales como el niobio, reduciendo así el Módulo de Young de la aleación hasta los 71GPa y acercándose de forma sustancial al del hueso (98,99).

Como hemos mencionado anteriormente, existen varios estudios que demuestran el buen comportamiento biomecánico y la biocompatibilidad de la aleación Ti-Nb-Zr en biomedicina, con nuevos tratamientos térmicos de la aleación y de la superficie e incluso con la adición de nuevos metales como el tántalo. Aún así, actualmente no existe evidencia suficiente que avale su utilización como material de fabricación de implantes dentales.

1.4.2.2.2 - Macrogeometría del implante

Con anterioridad, hemos comentado la importancia de conseguir una estabilidad primaria. La macrogeometría del implante es un factor determinante en la estabilidad que se consigue (100,101). En la industria se pueden encontrar implantes cilíndricos o cónicos

principalmente. También se encuentran diferencias en cuanto a la forma de la espira, o el paso de rosca. Todas estas modificaciones de los implantes van encaminadas a conseguir el éxito en las situaciones más desfavorables o pacientes con problemas óseos.

Los implantes cónicos se han diseñado tradicionalmente para mejorar los valores de estabilidad primaria y facilitar, por lo tanto, el procedimiento quirúrgico (102,103). Por consiguiente, si gozamos de una mayor estabilidad primaria, nos facilita en gran medida los protocolos de carga inmediata. Los implantes cónicos están diseñados para alojarse en huesos de baja densidad (tipo IV), ya que nos permite conseguir una muy buena estabilidad, incluso cuando el hueso es poco denso (102,104-106).

Diseño de la rosca.

Las características de diseño del implante dental, en particular el patrón y paso de la rosca, pueden ser responsables de las diferencias en la cantidad de hueso que rodea el implante y en el grado de aposición ósea (104,107).

La forma de la rosca está determinada por el grosor y ángulo de la misma. Las formas de rosca podrían ser en forma de V, forma cuadrada, contrafuerte y contrafuerte inverso (108). La forma de la rosca define el ángulo de esta, que es el ángulo entre una cara de la rosca y una línea imaginaria perpendicular al eje mayor del implante.

El paso de rosca hace referencia a la distancia entre las roscas, medida paralela al eje del tornillo. Los autores han determinado que si el paso de rosca disminuye, el área de superficie aumenta, lo que lleva a una distribución más favorable del estrés (109–111). Además, también ha sido demostrado que las tensiones son más sensibles al paso de rosca en hueso esponjoso que en hueso cortical (112).

La profundidad de la rosca se define como la distancia desde la punta de la rosca al cuerpo del implante. El ancho de rosca es la distancia apicocoronal en el mismo plano entre la zona superior e inferior de la rosca. Una vez integrado el implante, todos los conceptos definidos anteriormente (forma de la espira, paso de rosca, anchura de la espira etc.) van a ser determinantes en la transferencia de las cargas entre el implante y el hueso. Idealmente, las espiras deberían proporcionar una mejor estabilidad del implante al contacto óseo (112). Autores como Hansson y Werke concluyeron en un estudio de EF que la profundidad de la rosca (100-400 micrómetros), no afectaban a la distribución de la carga (113).

Diseño del módulo crestal

Se ha estudiado la forma de disipar las fuerzas de la manera más favorable en la porción mas coronal del implante, que a su vez es la más afectada por la tensión. La opción de añadir micro roscas en forma de anillo en la porción coronal, con el fin de disipar de la mejor forma posible, ha sido objeto de estudio en los últimos años. Dávila y

colaboradores (114) realizaron un estudio de elementos finitos comparando la tensión que generaba los implantes con diferentes diseños del cuello del implante. Compararon 4 diseños; totalmente pulido, con espiras y con 3 y cuatro anillos.

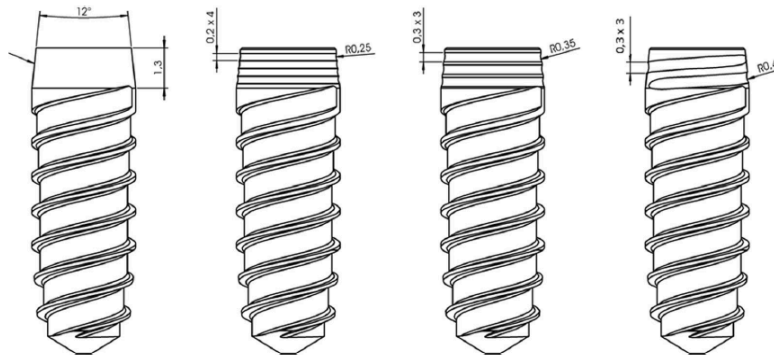


Ilustración 8. De izquierda a derecha: 1. Cuello mecanizado. 2. Cuello con 4 anillos. 3. Cuello con 3 anillos. 4. Cuello con espiras.

Los autores concluyeron que los diseños que mejor se comportaban biomecánicamente fueron los implantes con tres y cuatro anillos. Además del estudio in vitro de elementos finitos, extrapolaron los diseños de los implantes a un estudio animal. Colocaron los cuatro tipos de implantes en tibias de conejo, y después de 3 y 6 semanas comprobaron el BIC de cada uno de ellos. A las 6 semanas, el diseño que tuvo un mayor BIC fue el que contaba con tres anillos en su parte más coronal (114).

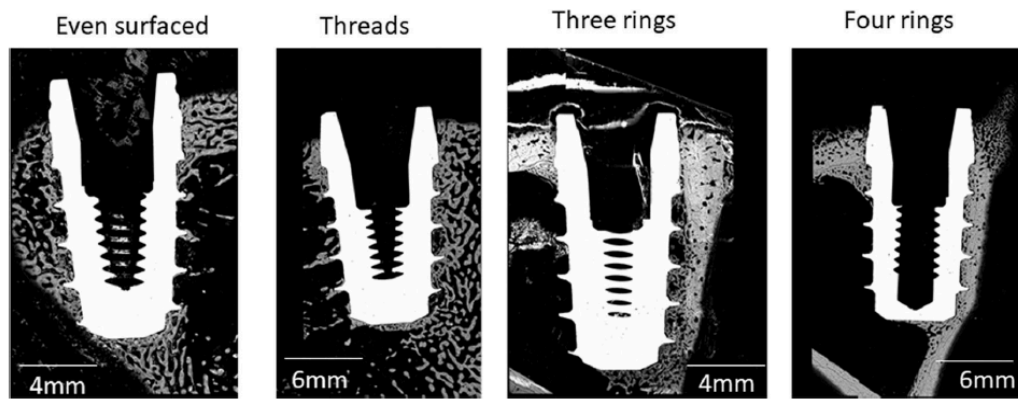


Ilustración 9. De izquierda a derecha: 1. Cuello mecanizado. 2. Cuello con espiras. 3. Cuello con 3 anillos. 4. Cuello con 4 anillos

Este estudio, coincide con lo publicado por autores como Abrahamsson y Berglundh, quienes creen que las microespiras en forma de anillo en la porción más coronal del implante ayudan a disipar las fuerzas. Los autores encontraron un aumento de BIC (*Bone Implant Contact*) a 10 meses en implantes con microespiras en la porción coronal (81.8%) en comparación con los implantes de control sin microespiras (72.8%) (115). En contra, otros autores, concluyen que las concentraciones más altas de tensión mecánica ocurren en las microespiras de estos implantes, cuando los comparamos con implantes con la zona crestal mecanizada o sin las microespiras (116–118). Por lo tanto, no queda claro en la literatura que la presencia de microespiras en la zona más coronal del implante puede afectar a la pérdida ósea marginal periimplantaria.

1.4.2.2.3 - Microgeometría del implante

La industria también ha trabajado mucho en mejorar las superficies de los implantes. Los objetivos principales de dichas modificaciones son conseguir un mayor contacto hueso implante (*BIC*) y una osteointegración más rápida. Los primeros implantes diseñados por Bränemark eran totalmente mecanizados, con superficies lisas. Se ha demostrado, que con las nuevas superficies rugosas, conseguimos un mayor BIC que con las superficies lisas o mecanizadas (119,120). Además, las superficies rugosas nos proporcionan, según autores como Abron o Novaes, una mayor proliferación celular, y por tanto una osteointegración más rápida (121,122).

La topografía superficial (Rugosidad y textura), podría considerarse la más importante de las propiedades que influyen en la respuesta del organismo. Las superficies de los implantes, en la mayoría de los casos, poseen topografías diseñadas y optimizadas para una mayor respuesta osteoblástica. Es necesario que las células encargadas de la aposición ósea reconozcan dicha rugosidad, por lo que deberá de ser del orden de la células (120). Según ciertos autores, los osteoblastos identifican una superficie rugosa cuando esta tiene al menos 2 micrómetros (123).

Los tratamientos que se han aplicado sobre la superficie de los implantes son muchos. Se distinguen principalmente tres grupos:

1. Limpieza de la superficie y/o eliminación de la capa superficial.
2. Modificación de la estructura y topografía (rugosidad de la superficie).
3. Modificación de la capa de óxido con el fin de conseguir superficies bioactivas.

Otra clasificación muy interesante es la que toma como base las propiedades fisicoquímicas del tratamiento empleado:

- Métodos mecánicos: Desbaste, pulido, mecanizado, granallado.
- Métodos químicos: limpieza con disolvente, ataque ácido, ataque alcalino, pasivado, anodizado y electropulido.
- Métodos al vacío: descarga lumínica, descarga eléctrica e implantación iónica.
- Métodos de recubrimiento: proyección por plasma, sol-gel, "magnetron sputtering" y ablación laser.
- Métodos bioquímicos: enlace de iones y/o moléculas activas por adsorción fisicoquímica, por enlace covalente con o sin espaciador, y por inclusión en materiales que actúan de portadores. (92)

Método	Efecto principal/propósito del tratamiento
Desbaste, pulido	Desincrustar restos sólidos de contaminantes, eliminar capas nativas/obtener un acabado superficial muy liso.
Granallado, arenado, granallado de pretensión	Desincrustar restos sólidos de contaminantes, eliminar capas nativas. Aumentar la rugosidad superficial/Mejorar la adhesión en el enlace/Introducir tensiones residuales.
Limpieza química con disolventes	Eliminar contaminantes.
Ataque/grabado ácido	Desincrustar restos sólidos de contaminante, eliminar capas nativas. Modificar la rugosidad superficial/Eliminar tensiones.
Ataque/grabado alcalino	Hidroxilar/Mejorar la formación de apatita: Conferir bioactividad/Aumentar la rugosidad superficial.
Pasivado en ácido o por tratamientos térmicos	Oxidar/Minimizar la liberación de iones.

Tratamiento con fosfatos de calcio y/u otros iones	Precipitar capas de apatita/Modificar la composición superficial.
Ataque con H ₂ O ₂	Oxidar, hidroxilar/Aumentar rugosidad por grabado/Limpiar y esterilizar/Eliminar capas nativas.
Electropulido	Eliminar tensiones/Obtener superficies lisas y uniformes.
Anodizado, Oxidación anódica	Modificar la estructura y la composición del óxido/mejorar la resistencia a la corrosión/Disminuir liberación de iones/Aumentar la rugosidad superficial/Obtener superficies porosas.
Tratamiento por descarga lumínica	Limpiar superficie/Eliminar capas nativas/grabar/esterilizar/Oxidar, nitrurar.
Tratamiento por descarga eléctrica	Aumentar la rugosidad superficial
Implantación iónica	Modificar la composición superficial/Mejorar la resistencia a la corrosión y el desgaste
Recubrimiento sol-gel	Recubrir con material bioactivo

Recubrimiento "magnetron sputtering"	por	Recubrir con material bioactivo/Aumentar la rugosidad
Recubrimiento por proyección plasma de fosfatos de calcio	por	Recubrir con material bioactivo/Aumentar la rugosidad
Recubrimiento por proyección plasma de titanio	por	Aumentar la rugosidad. Generar estructura microporosa.
Ablación láser		Recubrir con material bioactivo
Adsorción fisicoquímica de moléculas biológicas	de	Interaccionar selectivamente con las proteínas/Bioactividad
Enlace covalente de moléculas biológicas	de	Interaccionar selectivamente con las proteínas/Bioactividad
Recubrimiento de moléculas biológicas por inclusión de materiales portadores	de	Interaccionar selectivamente con las proteínas/Bioactividad.

Tabla 7. Resumen de los tratamientos superficiales más comúnmente empleados sobre el titanio, así como los principales efectos que tienen sobre las propiedades superficiales.

Los tratamientos de superficie más significativos, por ser los más empleados son aquellos que se realizan mediante la modificación física de la superficie del implante o mediante la modificación química:

- Modificación de la topografía del implante (Física): anodizado, granallado, ataque ácido y la proyección por plasma de titanio.
- Modificación química de la naturaleza de la superficie: ataque alcalino y proyección por plasma de fosfatos de calcio.

Nuestro trabajo va enfocado a analizar las partículas de titanio que se desprenden tras la inserción de los implantes dentales. Para ello es importante saber que el torque de inserción juega un papel fundamental, ya que, a mayor torque, mayor resistencia encuentra el implante a ser alojado en el hueso. Como ya hemos explicado anteriormente, la rugosidad de la superficie de los implantes va a ser un factor que modifique la estabilidad primaria de nuestros implantes. Las superficies rugosas han demostrado conseguir valores más altos de estabilidad primaria, debido a su capacidad de aumentar la superficie en contacto con el hueso (119,120). Existen diferentes métodos de crear superficies rugosas, entre los cuales se encuentran el granallado, grabado ácido y anodización. Los implantes granallados suelen tener superficies irregulares, con picos y valles que miden entre 4 y 6 μm (154). Los implantes grabados con ácido tienen una rugosidad uniforme en toda su superficie, con características más finas entre 1 y 3 μm (155). La capa de óxido en la superficie de un implante anodizado

puede tener un grosor de 0,3 a 7 μm , junto con una amplia variedad de características superficiales que miden de 0,3 a 7 μm (156). Es por eso por lo que en función de la macro y microgeometría del implante, la resistencia que encontrará el mismo al ser insertado en el hueso variará de forma significativa.

En un estudio in vitro realizado por Mints y colaboradores en el año 2014 (157), mostraron que en función del tipo de superficie, las partículas de titanio desprendidas de la superficie del implante eran variables. Aunque en todos los implantes colocados se encontraron modificaciones en la superficie, los implantes anodizados fueron los que salieron más perjudicados, ya que se eliminaron secciones de la capa gruesa de óxido, principalmente en la parte superior de las roscas y la región apical, asociadas con partículas sueltas de titanio (157). Los resultados del artículo de Mints y colaboradores coinciden con otros estudios in vitro, donde demuestran que la superficie de los implantes se ve alterada tras la inserción de los mismos (158–160).

1.4.2.3 - Factores dependientes de la técnica quirúrgica.

En los capítulos anteriores hemos visto como el propio implante puede ser determinante para conseguir una buena estabilidad primaria.

En casos en los que exista un lecho receptor con poca densidad, donde se pueda prever que la estabilidad primaria será deficiente, se podrán emplear ciertas técnicas quirúrgicas, con el objetivo de mejorar el ambiente óseo para la colocación del implante.

Las estrategias quirúrgicas más importantes son:

- El uso de osteotomos
- Fresas de densificación
- Infracresado del lecho

1.4.2.3.1 - Fresas de densificación.

Esta técnica se basa principalmente en la densificación de las paredes del lecho que alojará al implante. Al contrario que ocurre con las fresas de osteotomía convencionales, las fresas de oseodensificación, en lugar de cortar el hueso, lo que hacen es compactarlo contra las paredes del propio lecho receptor. La principal ventaja de estas fresas es el aumento de la densidad de las paredes óseas por compactación del hueso de la osteotomía. Estas fresas están indicadas para tratar huesos con muy poca densidad (tipo IV principalmente).

En contraste con el proceso de osteotomía convencional, que utiliza fresas con un ángulo de inclinación positivo para extraer un pequeño grosor de material con el paso de cada una de ellas, creando una osteotomía sin restos óseos en el orificio, el proceso de perforación de osteodensificación comienza con la creación de una osteotomía utilizando una fresa cónica con múltiples canales. Este procedimiento utiliza cuatro fresas cónicas en un ángulo de inclinación negativo para crear una capa de hueso compacto y denso que rodea la pared de la osteotomía. La fresa densificadora presenta un cincel de corte y un

vástago cónico que le permite aumentar progresivamente el diámetro y controlar el proceso de expansión (124). En resumen, el objetivo principal de esta técnica es la compactación de hueso autógeno alrededor del implante con el objetivo de aumentar la densidad y el contacto hueso implante (125,126). Lahens y colaboradores concluyen, al igual que otros muchos autores, que la utilización de fresas de oseodensificación aumenta la estabilidad primaria en hueso con poca densidad (124-129).

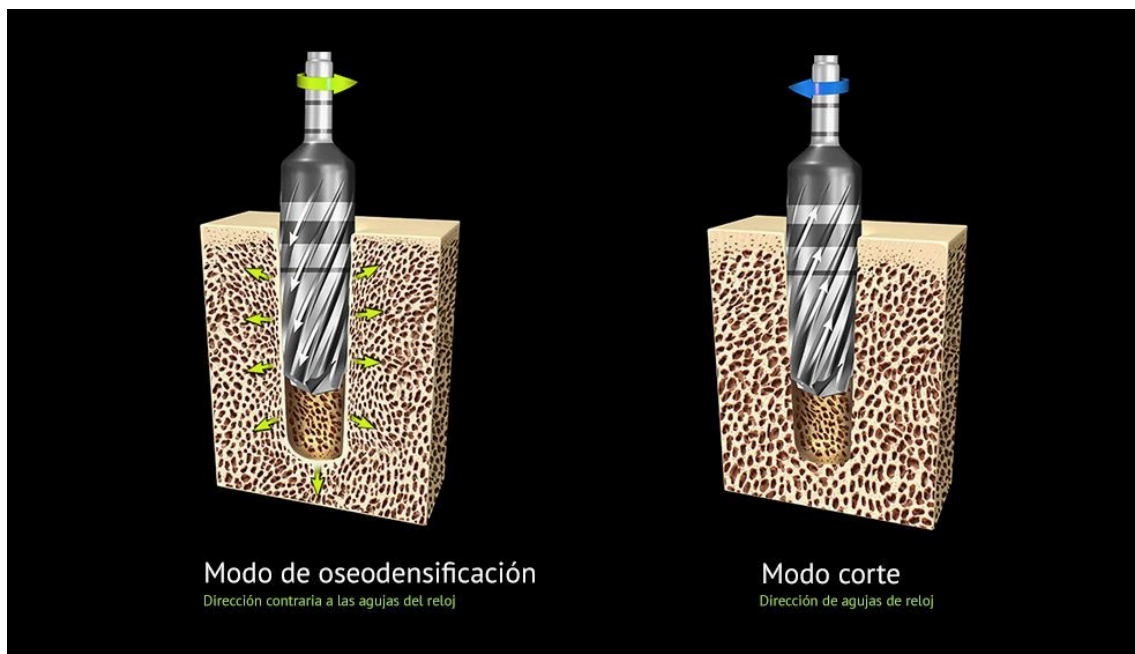


Ilustración 10. Fresa de oseodensificación vs convencionales.

1.4.2.3.2 - Uso de osteotomos

Al igual que las fresas de oseodensificación, los osteotomos crean el lecho implantario condensando el hueso, y no eliminándolo, aumentando así la densidad ósea en la zona en la que se colocará el implante.

Se ha publicado recientemente un estudio in vitro, en el que se colocan 60 implantes en costillas de vaca con técnicas de osteotomía diferentes. Comparan la estabilidad de los implantes, midiendo torque de inserción e ISQ, en función del método de colocación de los mismos, a saber; técnica de fresado convencional, usando osteotomos y mediante el uso de compactadores. Tanto el torque de inserción, desinserción como los valores ISQ fueron más altos cuando se usaban los osteotomos y/o compactadores de hueso. A su vez, los valores más altos de estabilidad fueron conseguidos con el uso de compactadores. Esto puede deberse a que los osteotomos realizan una condensación vertical mientras que los compactadores también condensan el hueso lateralmente, consiguiendo aumentar la densidad en las paredes del lecho periimplantario (130).

El estudio anterior coincide con lo publicado por otros autores, como el grupo del Dr. Pérez Pevida, que demostró en un estudio in vitro, que el uso de osteotomos incrementaba los valores ISQ, tanto en sentido vestibulo-palatino/lingual como mesiodistal (131).

1.4.2.3.3 - Infrafresado del lecho.

La técnica de infrafresado es una técnica muy utilizada en huesos blandos con el fin de obtener unos valores de estabilidad primaria mayores. El hecho de pasar una fresa menos de la indicada por el fabricante, o fresar a una menor longitud de la que luego colocaremos el implante, provocará una mayor fricción en el sistema hueso-implante y por lo tanto conseguiremos una mayor estabilidad primaria.

Campos y colaboradores demuestran en un estudio en perros Beagle que cuanto menos se fresa mayor torque de inserción se consigue. Estos resultados coinciden con otros muchos estudios (132-134).

1.4 - Titanio.

Ya hemos definido anteriormente las diferentes patologías periimplantarias que podrían ocasionar problemas en la salud de los implantes dentales. La mucositis genera la inflamación de los tejidos periimplantarios sin pérdida ósea mientras que la periimplantitis se define como la inflamación de los tejidos periimplantarios con pérdida ósea progresiva, pudiendo cursar con sangrado y/o supuración (7). Las etiologías más frecuentes se basan en el control de placa, correcto diseño de la prótesis, una adecuada banda de encía queratinizada o una cantidad suficiente de remanente óseo para la colocación del implante, entre muchas otras. No está claro que ninguna de las posibles causas mencionadas anteriormente provoque por sí solas un

fallo en la estabilidad de los implantes a largo plazo, ya que todos los autores definen dichas patologías como multifactoriales.

El titanio puro y las diferentes aleaciones de titanio son usadas comúnmente como biomateriales en traumatología y cirugía ortopédica. El titanio es un elemento perfectamente biocompatible gracias a sus magníficas propiedades físico-químicas, como la baja solubilidad en agua en un pH fisiológico, bajo nivel de toxicidad, y la baja reactividad con la moléculas del medio acuoso (135). Ya desde hace muchos años se viene investigando acerca de los desprendimientos de partículas e iones de titanio de los implantes dentales (136–140) y a pesar de sus cualidades inertes, se ha demostrado que el óxido de titanio se libera en concentraciones micromolares mediante mecanismos como el desgaste, corrosión y actividad biológica (141). Investigaciones recientes (141–144) han demostrado la presencia de partículas e iones no bioinertes en la mucosa periimplantaria, lo que ha creado una nueva línea de investigación en la implantología oral. Múltiples estudios han sugerido que el material desprendido de los implantes pudiera contribuir al desarrollo y progresión de las enfermedades periimplantarias.

En un estudio publicado por Okazaki y colaboradores en 2004, en el cual se compararon diferentes aleaciones metálicas, Co-Cr-Mo, Ti-6Al-4V, Ti-15Zr-4Nb-4Ta, entre otras, se encontraron cantidades mínimas de Ti, Al y V en los tejidos de la tibia con el implante Ti-6Al-4V. La

concentración de Ti con el implante Ti-15Zr-4Nb-4Ta fue más baja que con el implante Ti-6Al-4V. Las concentraciones de Zr, Nb y Ta también fueron muy bajas. Compararon las aleaciones mencionadas con aleaciones de acero inoxidable y aleaciones de Cromo y Niquel, entre otras, siendo las aleaciones de titanio las que menos partículas externas encontraban (141). Según Jacobs y colaboradores, una vez que esas partículas metálicas son liberadas a la circulación sistémica, dichos iones metálicos se unen a ciertas proteínas formando complejos similares a haptenos, los cuales pueden transportarse y acumularse en órganos por todo el cuerpo. Otros autores han demostrado que se pueden almacenar significativas concentraciones de titanio en hígado, bazo y ganglios linfáticos (142,144).

Estudios in vivo han demostrado que las partículas de titanio desprendidas de los dispositivos ortopédicos se acumulan en los tejidos periimplantarios. A este fenómeno se le denomina en inglés "aseptic loss", lo que se podría traducir como "pérdida de la asepticidad" del titanio (143). Este fenómeno es provocado por la interacción del medio con el titanio que compone la prótesis, que incluso en ausencia de desgaste por rozamiento, la inflamación podría provocar la pérdida de la capa de óxido de titanio (TiO_2), lo que provocaría la liberación de iones de titanio a los tejidos circundantes (144). También grandes cantidades de fluoruro perjudicaría la resistencia a la corrosión del titanio (145). Estas partículas han sido asociadas con la activación de la respuesta inflamatoria, provocando la liberación de citoquinas

proinflamatorias, como TNF- alfa, IL-1beta y RANKL. Otros autores, han asociado las partículas de titanio con la reducción de la viabilidad de las células de la médula ósea y la alteración de la homeostasis epitelial, incrementando el daño de la respuesta del ADN y el potencial compromiso de la barrera epitelial oral (146). Otros estudios demostraron que los restos de desgaste fagocitados por macrófagos inducen la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para la formación de parámetros proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF alfa). Sabemos que el TNF alfa influye en la expresión de RANKL y M-CSF en los osteoblastos promoviendo la maduración de los osteoclastos, lo que conduce a un aumento de la resorción ósea (147,148).

La pérdida ósea en ausencia de bacterias es la causa más común de reemplazo de la prótesis de cadera. Está demostrado que las partículas de desgaste que se originan a partir de los componentes protésicos interactúan con múltiples tipos de células en la región periprotésica dando como resultado un proceso inflamatorio que finalmente conduce a la pérdida ósea periprotésica. Estas células incluyen macrófagos, osteoclastos, osteoblastos y fibroblastos (149).

No solo la inserción o la posibilidad de corrosión pueden generar partículas de titanio, sino que, como demostró Blum y colaboradores, la conexión implante-pilar sufre desgaste durante la masticación. En su estudio, donde compararon un implante de conexión cónica antes y

después de los ciclos de masticación, evidenciaron el desgaste de la conexión entre ambos componentes (150).

Por lo tanto, podríamos pensar que uno de los posibles factores etiológicos del fallo en la supervivencia de los implantes dentales a medio y largo plazo, podrían ser, entre otros factores, las partículas de titanio desprendidas de la superficie del implante. Las posibles causas del desprendimiento de las partículas de titanio podrían ser, como ya hemos mencionado, el rozamiento y desgaste del propio dispositivo durante la inserción del mismo o el desgaste de la unión implante-pilar durante la masticación, la posible corrosión del titanio, liberando TiO_2 al medio oral o por la propia actividad biológica generada por la interacción celular con la superficie de los implantes (141,150).

Flatebo y colaboradores, en 2011, realizaron un estudio in vivo para comprobar la presencia de partículas de titanio tras la inserción de los implantes. Realizaron una biopsia del tejido blando previa a la colocación del implante (creando el grupo control) y de nuevo biopsiaron a los 6 meses, en el momento de la segunda fase de los implantes. Analizaron las muestras mediante espectrofotometría de masas de plasma (para la obtención de los isótopos 47, 48 y 49 Ti), microscopía electrónica de barrido (para confirmar el tamaño de las partículas de Ti) y mediante microscopía óptica de campo oscuro. Registraron las señales más altas para el isótopo 48 Ti con una abundancia de 73,72%. Se encontraron partículas de titanio tanto en

el grupo control como en el test, aunque con ligeras diferencias. En el grupo control el tamaño de las partículas se encontraban en el tejido epitelial y tenía un tamaño de 0,1-5 μm , mientras que en el grupo test, el tamaño de partícula era de 0,14-2,3 μm y se encontraba en la zona más profunda del tejido conectivo, en la zona en contacto con el tapón de cierre del implante (151). Este trabajo coincide con otros publicados, donde el tamaño de partículas de titanio es similar (0,1 μm - 12 μm), estableciéndose en los tejidos periimplantarios (150-153).

2 – OBJETIVOS

La inserción de los implantes dentales conlleva un desprendimiento de partículas de la superficie rugosa de titanio en las zonas del lecho óseo. El objetivo de la presente Tesis Doctoral es el análisis de estas partículas para implantes dentales de titanio y Ti-6Al-4V y determinar la influencia en el comportamiento biológico

3 – MATERIALES Y METODOLOGIA EXPERIMENTAL

En este estudio se utilizaron costillas de bovino frescas de diferentes animales que se limpiaron de todos los residuos de tejidos blandos. Cuando se recibieron las muestras, se sumergieron inmediatamente en etanol / solución salina al 50%, lo que provoca una disminución de menos del 2% en el módulo de Young del tejido óseo durante un máximo de 90 días. Las pruebas se realizaron dentro de los primeros

5 días en una habitación a temperatura ambiente. Las pruebas se realizaron a temperatura ambiente porque aumenta el módulo de Young del hueso solo entre un 2% y un 4%, en comparación con una prueba de muestras de hueso a 37 ° C.

Debido a que las muestras de hueso conservadas en solución de etanol perdieron algo de agua residual, las muestras se dejaron en remojo en solución salina isoosmótica durante 12 horas antes de la prueba y durante este período se refrigeraron. Las muestras de huesos se dejaron reposar a temperatura ambiente (23°C) durante 3 horas. Durante este período y en los períodos de medición posteriores, las muestras se envolvieron con gasa empapada en solución salina para mantener la hidratación.

Para determinar las partículas que se desprenden de los implantes dentales de titanio en la colocación de estos a nivel óseo, se estudiaron 41 implantes dentales de titanio en las costillas frescas de bovino, siguiendo estrictamente las especificaciones del fabricante Klockner® en cuanto al fresado e inserción de los implantes. Estos implantes cuentan con tratamiento de sand-blasting con abrasivo de alúmina. Los implantes correspondieron al modelo Vega®, de la empresa Klockner®. En la Figura 1 pueden observarse los implantes dentales estudiados.

El implante VEGA® es un implante de doble espira y de inserción suave que posibilita el abordaje de zonas anatómicas comprometidas gracias al diseño atraumático de la zona apical. Su ápice ligeramente cónico y cuerpo paralelo facilitan el guiado por la osteotomía. La altura del implante dental es de 14 mm y su diámetro de 4 mm.

El polígono hexagonal situado en la parte inferior del cono ha sido diseñado para conferir al sistema las siguientes cualidades:

- Facilita el manejo clínico y el correcto posicionamiento de los componentes protésicos gracias a su buena sensación táctil.
- Optimiza la precisión de ajuste entre el hexágono de la conexión interna del implante y el hexágono de los aditamentos.
- Minimiza los movimientos de rotación entre implante y los componentes protésicos.



Ilustración 11. Implante dental Vega® de nivel óseo.

El diseño cónico del implante en su porción más coronal permite una distribución de cargas al tejido óseo adyacente y ayuda a mantener el hueso cortical. Los tres anillos reducen el estrés en la zona crestal y evitan la pérdida ósea cuando se produce la carga de los implantes. La altura del cuello es de 1.3 mm.

El cono interno del implante se ha diseñado con una angulación de 10° y 1.1 mm de longitud que permite:

- Optimizar el ajuste entre el cono del implante y el cono del aditamento protésico.
- Aumentar la estabilidad mecánica y distribuir homogéneamente las cargas.
- Dotar a la unión implante-pilar de una alta resistencia y estabilidad frente a los micromovimientos.
- Facilitar al profesional la inserción y el guiado de los diferentes aditamentos.
- El sellado hermético inferior a una micra impide la colonización bacteriana en el interior del implante.



Ilustración 12. Conexión implante dental Vega®.

La superficie de los implantes dentales es rugosa para la mejora de la osteointegración con un valor de rugosidad $S_a 1.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$. Este valor optimiza la adhesión de osteoblastos y reduce la colonización y la adhesión bacteriana.

Gracias al bombardeo de partículas abrasivas de óxido de aluminio de 10 micrómetros de diámetro a una presión de 5 bares se puede obtener esta rugosidad y además se aumenta la dureza superficial del titanio. En la Figura 3 se puede observar una máquina de granallado donde se efectúa el tratamiento de superficie de los implantes dentales. El aumento de la dureza superficial del titanio también le otorga un aumento en su vida a fatiga y por tanto mejora el comportamiento a largo plazo del implante dental ante las cargas masticatorias.

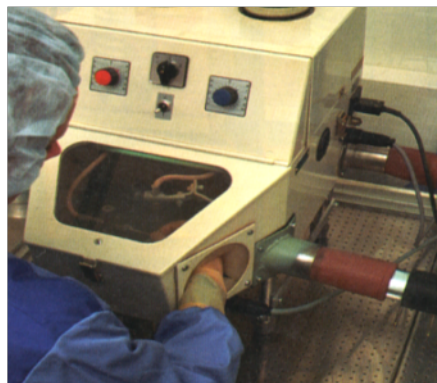
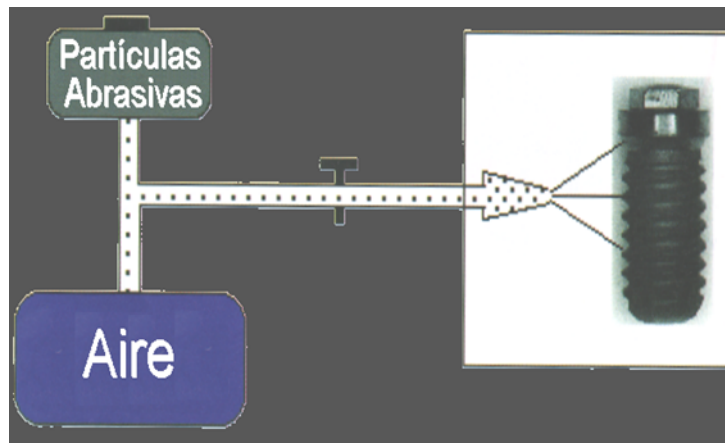


Ilustración 13. Máquina de sand-blasting para dar rugosidad a los implantes dentales.

Después del granallado para ofrecerle rugosidad y mejora de las propiedades mecánicas al implante dental se le realiza un tratamiento de pasivado con ácido que protege al implante del intercambio iónico en el medio y, por lo tanto, de la corrosión del material. La capa de óxido de titanio que constituye el pasivado es de aproximadamente 1 micrómetro.

En la Ilustración 15 se puede observar la topografía superficial del implante dental, con estructuras de picos y valles propia del bombardeo de partículas abrasivas.

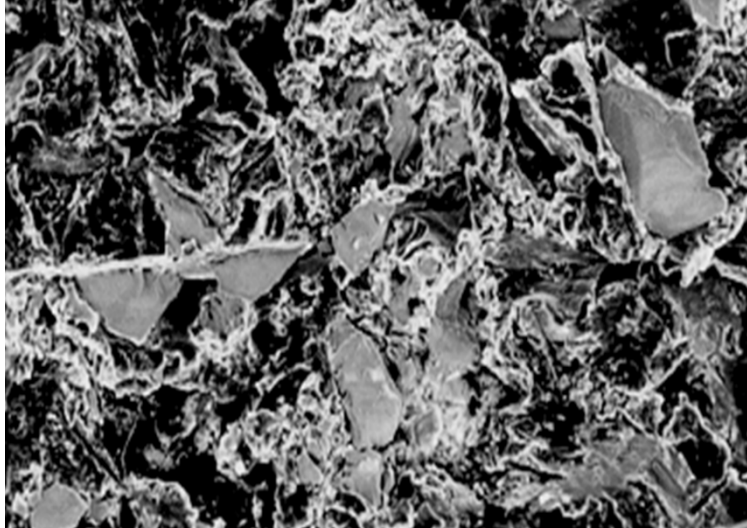


Ilustración 14. Superficie del implante dental estudiado

El pasivado protege el implante de un posible intercambio iónico con el medio, además de la corrosión del material. Además, este proceso limpia la superficie del material de cualquier impureza o residuo [*]. En la Ilustración 16 se puede observar una imagen de microscopía electrónica de barrido de la capa pasivada, que puede oscilar entre algo más de 6 nm hasta 2 micrometros. Esta capa de óxido de titanio protege al implante dental de los agentes químicos que podrían afectar a la corrosión.

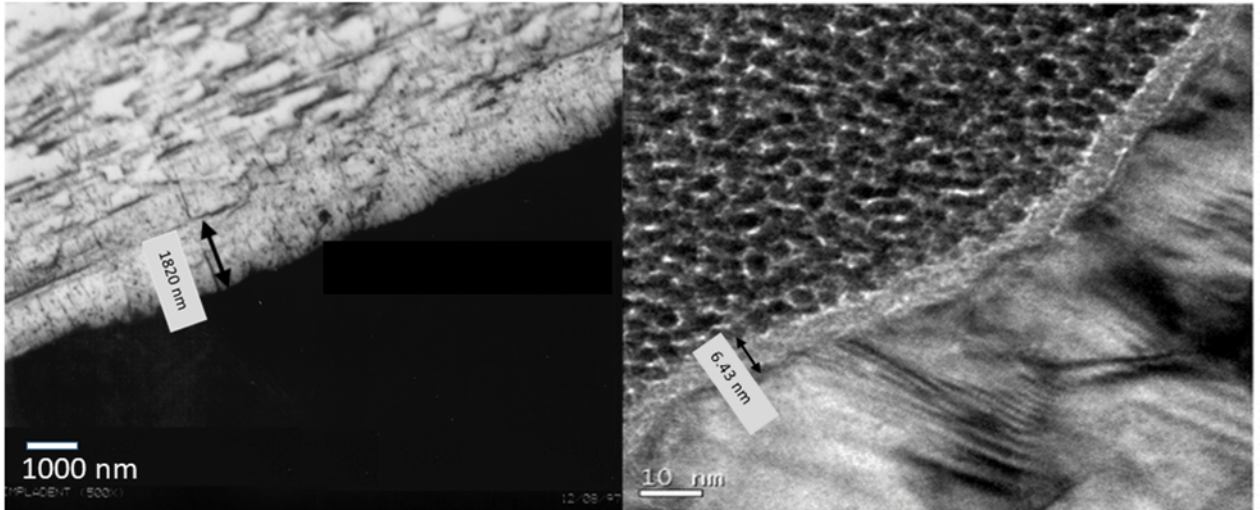


Ilustración 15. Capa de pasivado del implante dental.

Los implantes que se implantaron en hueso fresco de ternera siguiendo los protocolos marcados para su colocación por la propia empresa, se analizaron mediante estudio de microtomografía de alta resolución en tres dimensiones.

Para ello se cortaron las muestras de hueso con el implante dental y se escanearon en Microtomografía computarizada, CT scanner de alta resolución (Bruker XT H 225), como se muestra en la Ilustración 17, con tres diferentes condiciones de Rayos X:

- Voltaje de 90 Kv e intensidad de corriente de 90 μ A, no utilizando filtro.
- Voltaje de 120 Kv e intensidad de corriente de 200 μ A, utilizando un filtro de cobre de 0.76 mm de espesor.
- Voltaje de 135 Kv e intensidad de corriente de 290 μ A, utilizando un filtro de cobre de 1.27 mm de espesor.

Se realizaron 720 proyecciones y 2 encuadres por proyección y se reconstruyeron las estructuras en tres dimensiones.

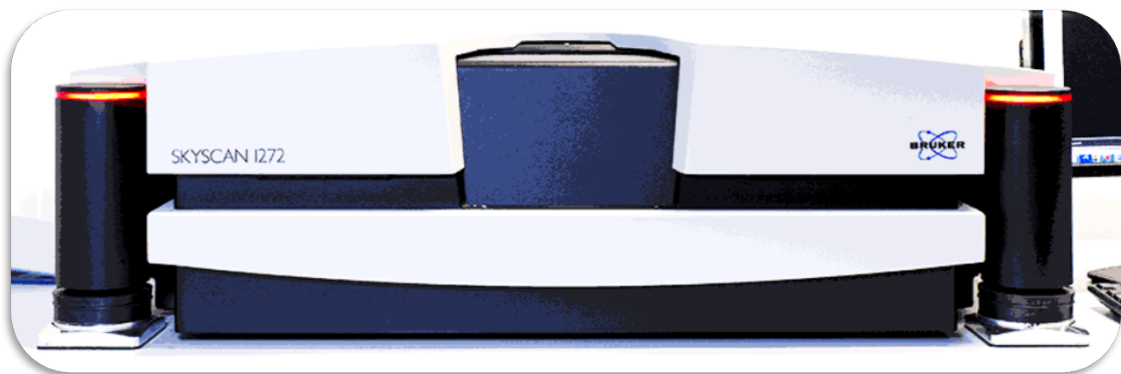


Ilustración 16. Micro-Tomografía computarizada, CT scanner de alta resolución utilizado.

Se fueron realizando proyecciones en tres dimensiones y con las condiciones de menor voltaje y menos intensidad de corriente no se observaron partículas. Para mejorar la resolución tuvimos que aumentar a los voltajes de 135 Kv y 200 microamperios. Este hecho hace que las muestras se observen durante 250 horas para tener una resolución máxima. En la Ilustración 18 puede observarse una imagen captada del equipo de microtomografía de alta resolución.

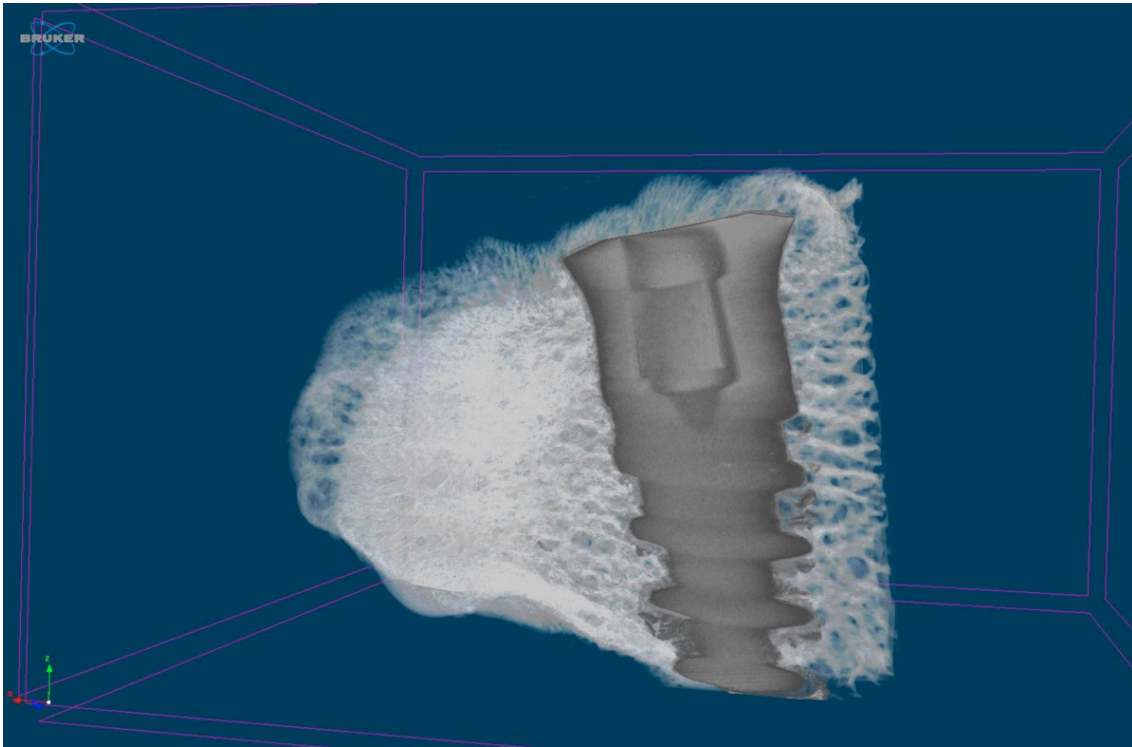


Ilustración 17. Imagen del implante implantado en la costilla de ternera en tres dimensiones. Las figuras se recogen en video y se pueden analizar mediante sistemas informáticos de análisis de imagen.

Estos resultados indican que, siguiendo los protocolos de la empresa comercial en la colocación de los implantes dentales, las cantidades desprendidas son mínimas y con partículas de pequeño tamaño. Hay que tener en cuenta que, en ocasiones, los clínicos por una imprudente rapidez no pasan las fresas de diferentes diámetros y colocan el implante para obtener también una importante fijación primaria con la cortical. Sin duda, este tipo de colocación generará más partículas, aunque en principio las partículas oscilarán entre 5 a 20 micrómetros ya que las partículas que se desprenden provienen de la rugosidad del

implante dental en la fase de cuello. Los tamaños de partículas corresponden a los picos en la rugosidad de los implantes dentales.

Las partículas observadas mediante microtomografía computarizada fueron extraídas y se observaron con un tono más oscuro que el titanio del implante dental. Este hecho se debe a que las partículas han sufrido un proceso de deformación plástica del material adquiriendo energía interna que facilita los procesos oxidativos de las partículas. El tono ligeramente oscurecido es propio de un óxido mixto de titanio.

La extracción de las partículas se realizó por calcinación del hueso en un horno de resistencias Hobersal XG15-18 de temperatura máxima de 1800°C, se utilizó para la calcinación una temperatura de 1200°C, se obtuvieron en las cenizas los restos del componente inorgánico del hueso que era fosfatos de calcio y las partículas metálicas de titanio de residuos. La separación de las partículas fue realizada mediante procesos de separación por densidad en medio acuoso.

No se pudo utilizar sistemas magnéticos ya que la susceptibilidad magnética del titanio es muy pequeña y no había posibilidad de magnetizar.



Ilustración 18. Horno de resistencias para calcinación de la muestra.

Se obtuvieron una media de 4,4 partículas de titanio por implante en los diferentes implantes dentales estudiados, siendo en el 94% de los casos de tamaños entre 10 y 20 micrómetros, un 2% de mayor tamaño y un 4% de menor tamaño dentro de la sensibilidad del equipo que es aproximadamente de 0.5 micrómetros.

Con las partículas que pudimos obtener de las implantaciones no tuvimos muestra suficiente para poder realizar los estudios de caracterización físico-química y biológica, debido a que las normas internacionales solicitan una gran cantidad de muestra para hacer los ensayos siguiendo las normas.

Se realizó una búsqueda de partículas del mismo tamaño, forma y energía para poder realizar todos los ensayos. Se comprobó la composición química y nanodureza (lo que indica que tiene las mismas propiedades mecánicas), así como la morfología y morfometría.

Se compraron partículas de titanio c.p. y de Ti6Al4V de 15µm a la empresa Nanoshel (UK) Limited para estudiar in vitro el efecto que podría tener el material de las partículas sobre los tejidos circundantes en la colocación de los implantes.

Estas partículas adquiridas poseen una energía interna muy similar a las obtenidas tras la colocación de los implantes en las costillas bovinas, hecho que se comprobó con nanoindentación.

Se analizó la superficie específica, la granulometría y la morfología de estos materiales en forma de polvo, así como la citotoxicidad y la cantidad de iones que liberan al medio estos materiales.

3.1. SUPERFICIE ESPECÍFICA – ASAP 2020 (BET)

El análisis de la superficie específica se realizó mediante el equipo ASAP 2020 (Micromeritics). Se utilizó nitrógeno como adsorbato. Las muestras utilizadas de polvo de tres tamaños distintos se

desgasificaron a 100°C en condiciones de vacío (10 μ Hg). Se analizó la superficie específica mediante la aplicación de los cálculos matemáticos descritos por la teoría BET (Brunauer–Emmett–Teller).



Ilustración 19. Equipo de análisis de la superficie específica.

3.2. GRANULOMETRÍA

El análisis de la granulometría de las tres muestras se realizó mediante la utilización de un equipo Mastersizer 3000 (Malvern Panalytical), que utiliza la técnica de difracción por láser para medir el tamaño de las partículas midiendo la intensidad de luz dispersada a medida que un rayo láser pasa por la muestra de partículas dispersas.

A continuación, estos datos se analizaron para calcular la medida de las partículas según el patrón de dispersión.

Este ensayo se realizó en medio húmedo, utilizando etanol como medio líquido de dispersión, utilizando la cantidad necesaria de polvo para que la obscuración de dispersante y la muestra fueran del 7%. El rango de tamaño de las partículas que se puede analizar con este equipo está comprendido entre 10nm y 3.5mm. Para evitar la posible aglomeración de las partículas de polvo durante el ensayo de granulometría se utilizó agitación mecánica (2500 rpm) y ultrasonidos (50% de sonicación).

Para poder realizar el ensayo se debe escoger el índice de refracción del titanio a analizar. Se realizó un ensayo de DRX para conocer este dato. El valor que se escogió fue el de la fase anatasa, con un índice de refracción de 2,51.



Ilustración 20. Equipo de granulometría.

3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La morfología de las partículas de polvo se evaluó mediante la utilización de técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM), mediante la utilización de un microscopio SEM, Phenom XL Desktop SEM, (PhenomWorld) con un voltaje de aceleración de 15 keV.

Para observar las muestras, se colocaron sobre una cinta de carbono adhesiva conductora y se observaron al microscopio. Al ser un material conductor no se recubrió con carbono.

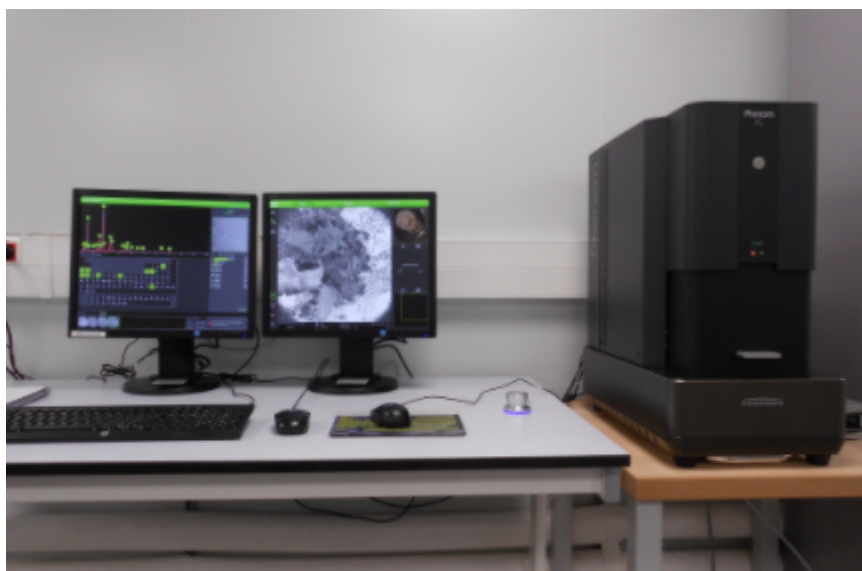


Ilustración 21. Microscopio electrónico de barrido

3.4. LIBERACIÓN DE IONES METÁLICOS

Se evaluó la liberación de iones metálicos al medio por parte de las 2 muestras de titanio y de Ti6Al4V siguiendo la norma ISO 10993-12-2009. Según la norma se utilizó una proporción de medio/polvo a razón de 1ml por cada 0.2g de polvo de titanio.

Se prepararon un total de 3 muestras de análisis para cada una de las muestras a ensayar, a razón de 10ml de medio y 2g de cada muestra.

El medio utilizado fue Hank's (Sigma-Aldrich, Co Life Science, St. Louis, USA) que al estar certificado permite menos variabilidad entre ensayos. El líquido en contacto con el polvo se recuperó y se filtró con un filtro de tamaño de partícula de 0.22 μ m. Para su análisis, se acidificó con ácido nítrico (HNO₃ 69.99%, Suprapur, Merck) al 2% para evitar la precipitación de los iones metálicos antes de la medida de su concentración mediante ICP.

Se definieron 5 tiempos de extracción: 1 día, 3 días, 7 días, 14 días y 21 días tal y como se ha realizado en otros estudios similares (Gutensohn et al. 2000). Las muestras se mantuvieron a 37°C en un incubador y se agitaron a 250rpm, con un ángulo de inclinación de 30° con el fin de incrementar la agitación y evitar la decantación del polvo durante el ensayo.

Las muestras se analizaron mediante espectroscopia de masas por emisión de plasma con acoplamiento inductivo ICP-MS (Perkin Elmer Elan 6000", PERKIN ELMER INC, USA), técnica que permite realizar un análisis cuantitativo multielemental y con una precisión de 1ppt para el 90% de los elementos de la tabla periódica.

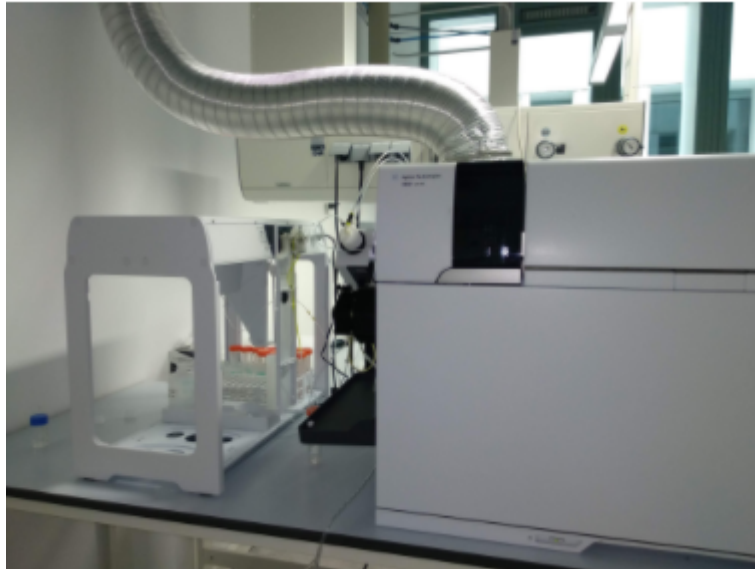


Ilustración 22. Equipo de espectroscopía de masas por emisión de plasma con acoplamiento inductivo ICP-MS

3.5. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Se evaluó la citotoxicidad de 2 tipos de muestras de 15 μ m de tamaño de partícula, una muestra fue de titanio y la otra de Ti6Al4V mediante determinación por exposición indirecta según la norma UNE. Todas las condiciones estudiadas en el ensayo de citotoxicidad se han realizado por triplicado (n=3), siendo las muestras estudiadas las que se exponen a continuación:

Muestras de estudio: polvo de titanio y de Ti6Al4V.

Control positivo: células sembradas directamente sobre la placa.

Control negativo: medio sin células.

La manipulación de las muestras se realizó de forma aséptica durante todo el ensayo.

El ensayo de citotoxicidad consiste en evaluar el porcentaje de supervivencia celular que presenta una línea de células conocida cuando se expone a un medio que ha estado en contacto con un material dado. En este caso, se ha realizado un ensayo de citotoxicidad por contacto indirecto según las directrices especificadas en la norma ISO 10993-5 "Biological evaluation of medical devices", parte 5 "In vitro cytotoxicity tests". Para cuantificar la citotoxicidad se calcula el índice de supervivencia celular, el cual indica citotoxicidad si es menor al 70%.

De acuerdo con la norma y debido a que estas partículas están en contacto tanto con hueso como con tejido blando de la encía, se utilizaron las células SAOS-2 (ATCC® HTB-85) y HFF-1 (ATCC® SCRC-1041). Las células se almacenan usando dimetilsulfóxido como criopreservante a -180°C , y se ensayan bimensualmente para verificar la ausencia de micoplasma.

Las células se cultivaron en un incubador con control de humedad y suministro de CO_2 al 5%. Según recomendación del fabricante, se usó McCoy's Medium (Fisher Scientific) para el cultivo de SAOS-2 y Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Fisher Scientific,) para el cultivo de HFF-1, suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal (FBS, Life Technologies), 1% de L-glutamina (Fisher Scientific) y 1%

de penicilina/estreptomicina (Fisher Scientific). El medio se almacena a 4°C, y los suplementos a -20°C.

Se realizó el ensayo de los extractos, según el apartado 8.2 de la norma ISO 10993-5. Para ello, se incubó cada material en medio suplementado a una ratio de 1ml. por 0.2g de muestra, durante 72h a 37°C. Las células se sembraron a una densidad de $2 \cdot 10^4$ células/mL 24h antes de ponerlas en contacto con los extractos de las muestras. Se usó como control positivo las células sembradas en la placa de pocillos tratada, y como control negativo el medio sin células.

Las células se incubaron 24h con el extracto sin diluir y diluido $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$ y $\frac{1}{1000}$, usando medio completo para las diluciones. Se observaron las células para verificar la adhesión y morfología, antes y después de ponerlas en contacto con los extractos. Una vez finalizado el ensayo se lisaron las células con Mammalian Protein Extraction Reagent (mPER), y se analizó la viabilidad celular a partir de la actividad de la encima lactato deshidrogenasa (LDH, Roche Applied Science). El cálculo de la viabilidad se realizó según recomendaciones del fabricante, midiendo la absorbancia a 492 nm.



Ilustración 23. Cabinas de cultivo celular.

3.6. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Realizamos 3 ensayos distintos para evaluar la respuesta inflamatoria que provocan las micropartículas de titanio en un cultivo celular de fagocitos.

- Realizar un ensayo de citotoxicidad de las micropartículas de titanio cultivadas en la línea celular de fagocitos para obtener la concentración adecuada para el cultivo celular.
- Realizar un ensayo *in vitro* de la respuesta inflamatoria en diferentes muestras de micropartículas de titanio.
 - Analizar la expresión génica de marcadores típicos de la inflamación celular.
 - Analizar la expresión proteica de marcadores típicos de la inflamación celular.

3.6.1. Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad consiste en evaluar el porcentaje de supervivencia celular que presenta una línea de células conocida cuando se expone a un medio que ha estado en contacto con un material dado. En este caso, se realizó un ensayo de citotoxicidad por contacto indirecto según las directrices especificadas en la norma iso 10993-5 "biological evaluation of medical devices", parte 5 denominada "*in vitro* cytotoxicity tests". Para cuantificar la citotoxicidad se calcula el índice de supervivencia celular, el cual indica citotoxicidad si es menor al 70%.

Se evaluó la citotoxicidad de 2 muestras de polvo de titanio de un tamaño de 15 μm , pero de distinta composición (titanio y una aleación de titanio, aluminio y vanadio Ti6Al4V) mediante la determinación por exposición indirecta.

Todas las condiciones estudiadas en el ensayo de citotoxicidad se realizaron por triplicado ($n=3$), siendo las muestras estudiadas las que se exponen a continuación:

- muestras de estudio: polvo de titanio (dos composiciones).
- control positivo: células de fagocitos sembradas directamente sobre la placa.
- control negativo: medio sin células.

La manipulación de las muestras se realizó de forma aséptica durante todo el ensayo.

De acuerdo con la norma y debido a que estas partículas generan una respuesta inflamatoria en contacto con el tejido, se utilizaron las células thp-1 (dsmz, acc 16). Las células se almacenan usando dimetilsulfóxido (dmsó) como criopreservante a -180°C (nitrógeno líquido), y se ensayan bimensualmente para verificar la ausencia de contaminación por micoplasma.

Las células se cultivaron en un incubador con control de humedad, a una temperatura de 37°C y suministro de CO_2 al 5%. Según recomendación del fabricante, se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma) y 1% penicilina-estreptomina (Fisher Scientific). El medio se almacena a 4°C y los suplementos a -20°C .

Se realizó el ensayo de los extractos, según el apartado 8.2 de la norma ISO 10993-5. Para ello, se incubó cada material en medio suplementado a una ratio de 0.2 g de muestra por mililitro de medio,

durante 72h a 37°C. Las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 células/ml 24 horas antes de ponerlas en contacto con los extractos de las muestras. Se usó como control positivo las células sembradas en la placa de pocillos tratada, y como control negativo el medio sin células.

Las células se incubaron durante 24 horas con diferentes diluciones del extracto: el extracto sin diluir y diluido 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000, usando medio completo para las diluciones. Se observaron las células por microscopía óptica para verificar la adhesión y morfología, antes y después de ponerlas en contacto con los extractos. Una vez finalizado el ensayo, se evaluó la viabilidad celular usando el protocolo del *Resazurin sodium salt* (Sigma) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este ensayo utiliza un producto azul (el resazurin) que es reducido por las células y forma un producto de diferente coloración (resorufin), que permite ser analizado por absorbancia. Para ello, se preparó una dilución con medio completo de resazurin (concentración inicial 5 mg/mL) hasta obtener una concentración final de 10 µg/ml y se cultivó las células con el medio con resazurin durante 3 horas en el incubador a 37°C y con un 5% CO₂. Posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm mediante un lector de placas.

Este procedimiento se realizó a las 24 y 48 horas desde el cultivo con el extracto.

3.6.2. Ensayo de respuesta inflamatoria

Para el ensayo de la respuesta inflamatoria, se cultivaron las células THP-1 en un cultivo en adhesión para poder diferenciarlas a macrófagos (células con capacidad pro o anti-inflamatoria en función del estímulo). Para diferenciar las células THP-1 en macrófagos, se sembraron 3×10^4 células/cm² y se expusieron a *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA, Sigma) a una concentración final de 10 ng/mL durante 6 horas. Las células se estimularon con 100 ng/mL de LPS (Sigma) durante 24 y 48 horas como control positivo de un estímulo pro-inflamatorio. Además, las células cultivadas en medio de cultivo sin extracto se utilizaron como control negativo de la inflamación (TCP). Se guardó el sobrenadante para su análisis de proteína y se levantaron las células para su extracción de RNA a las 24 y 48 horas, y se almacenó a -80°C hasta su análisis para preservar la actividad biológica.

3.6.3. Análisis de expresión de genes

La expresión génica se analizó mediante reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Brevemente, se aisló el RNA total utilizando el kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) que incluía el tratamiento con DNasa, siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, 1 µg de RNA con una relación de intensidades en las

longitudes de onda de 260/280 nm entre 1.8-2 se transcribió a la inversa en cDNA utilizando Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron *primers* específicos (CCR7, TNF α and IL-1 β como marcadores proinflamatorios, y CD206, TGF- β and IL-10 como marcadores antiinflamatorios) y FastStart Universal SYBR Green Máster (Roche) para amplificar el cDNA deseado. Finalmente, las amplificaciones se realizaron en un CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) para la PCR cuantitativa en tiempo real. Este procedimiento se realizó a las 24 y 48 horas desde el cultivo con el extracto.

3.6.4. Análisis de expresión de proteínas

El análisis de proteínas se realizó mediante kits de ELISA (Invitrogen) y el protocolo se realizó siguiendo las pautas del fabricante. Este kit permite detectar la concentración de diferentes marcadores (IL-10, IL-1 β y TNF α) mediante una reacción enzimática con anticuerpos. Brevemente, el sobrenadante de las células cultivadas en el caso de las interleukinas (IL-10 e IL-1 β) se realizó una primera incubación de la muestra con el anticuerpo durante 3 horas a temperatura ambiente en un *microplate shaker*.

En el caso del TNF α es ligeramente diferente el protocolo, en vez de realizar una única incubación, se realizan dos incubaciones, una de 2 horas y posteriormente una segunda de de 1 hora, ambas a

temperatura ambiente en un *microplate shaker*. A continuación, en los 3 marcadores se realizaron 6 lavados con (PBS - 1% Tween 20) y se incubaron durante 10 minutos las muestras con la solución sustrato (colorante *tetramethyl-benzidine* que se une a las muestras). Finalmente, se paró la reacción del sustrato con 1M Ácido Fosfórico y se procedió a la lectura de la absorbancia a 450 nm en un lector de placas.

4. RESULTADOS

4.1. SUPERFICIE ESPECIFICA

En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos mediante BET para la determinación de la superficie específica de los polvos evaluados, cuyas gráficas isotermas están presentes en la ilustración 24.

Muestra	SUPERFICIE ESPECIFICA (m ² /g)	COEF. CORRELACION	C
Ti-15μm	0.4305±0.037	0.9998	163.7634
Ti6Al4V-15μm	0.4401±0.025	0.9999	46.5206

Tabla 8. Superficie específica de las 2 muestras estudiadas.

Las dos muestras analizadas presentan una superficie específica similar, lo que sería indicativo de una distribución de tamaños de partícula equivalente.

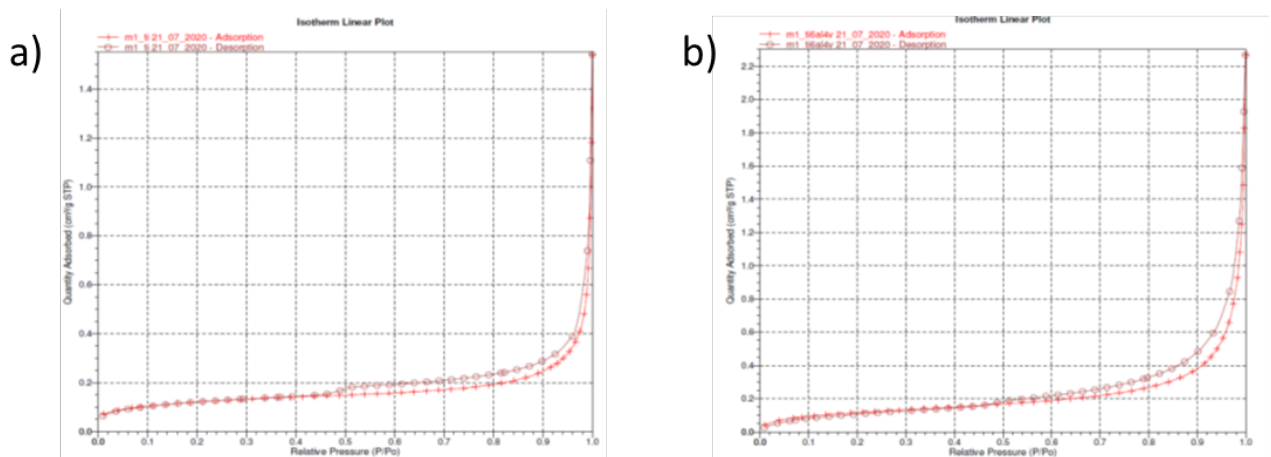


Ilustración 24. Isotermas del ensayo BET del polvo Ti-15μm y del polvo Ti6Al4V-15 μm.

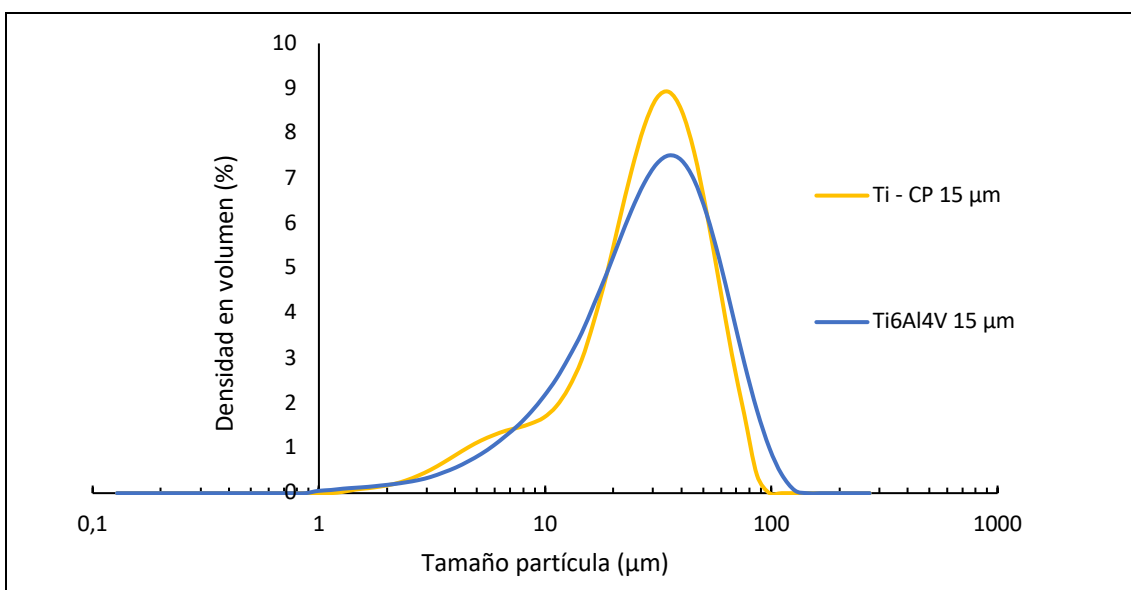
4.2. GRANULOMETRIA

Las muestras analizadas han presentado un valor medio de diámetro equivalente prácticamente idéntico, tal y como puede observarse en la tabla 9.

En la gráfica 1 se muestran las curvas de distribución del tamaño de partícula de ambos polvos analizados. El análisis comparativo de ambas curvas muestra un valor medio de partícula prácticamente idéntico, aunque con una leve pero mayor presencia de partículas finas de menor tamaño en el polvo de Ti6Al4V-15 μ m.

Muestra	Valor medio del diámetro equivalente (μ m)
Ti-15 μ m	15.1 \pm 0.07
Ti6Al4V15 μ m	15.6 \pm 0.73

Tabla 9. Resultados del valor medio de diámetro de las partículas analizadas.



Gráfica 1. Gráfica de distribución del tamaño de las muestras.

4.3. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Se han realizado imágenes a diferentes aumentos para cada muestra, los aumentos son x500, x1000 y x2500, que han permitido observar una morfología de tipo irregular de las partículas en ambas muestras evaluadas (Ilustración 25).

A nivel morfológico, el análisis SEM no ha mostrado grandes diferencias entre las muestras de Ti-15 μm y Ti6Al4V-15 μm , aunque sí parecería observarse una mayor cantidad de partículas finas en las muestras de Ti6Al4V-15 μm . dichos resultados confirmarían los datos aportados por las mediciones de granulometría láser. El análisis SEM ha mostrado una geometría heterogénea, con un acabado rugoso e irregular en todos los polvos evaluados, que serían producto de algún tipo de proceso de síntesis por molturación.

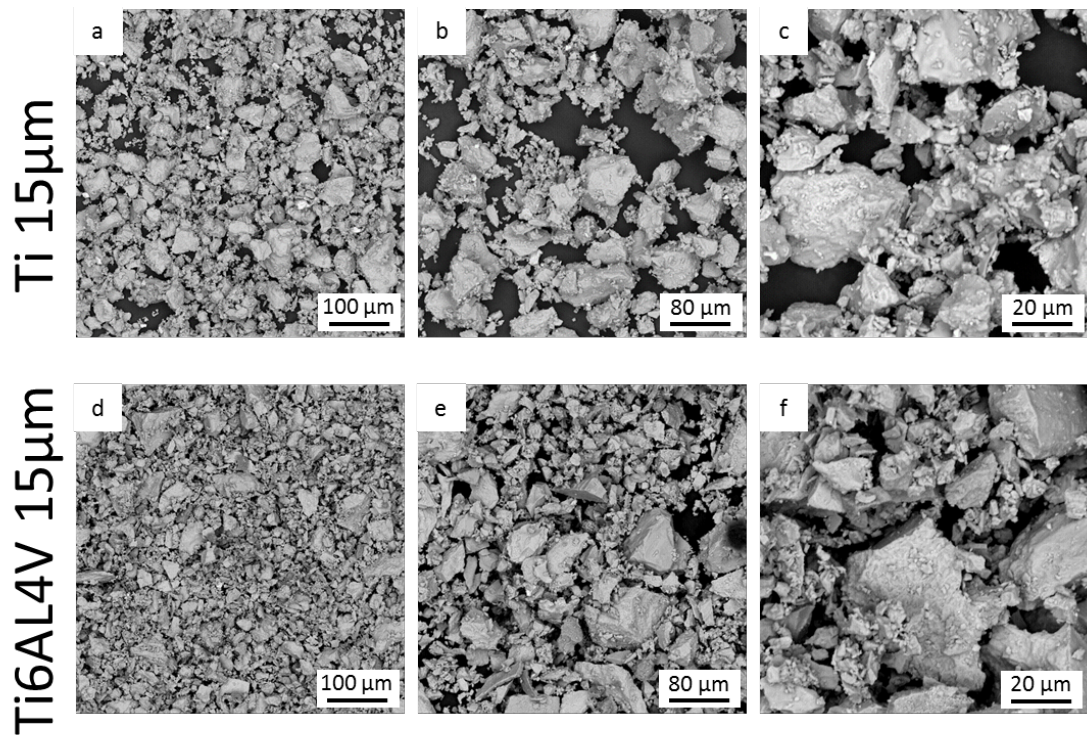
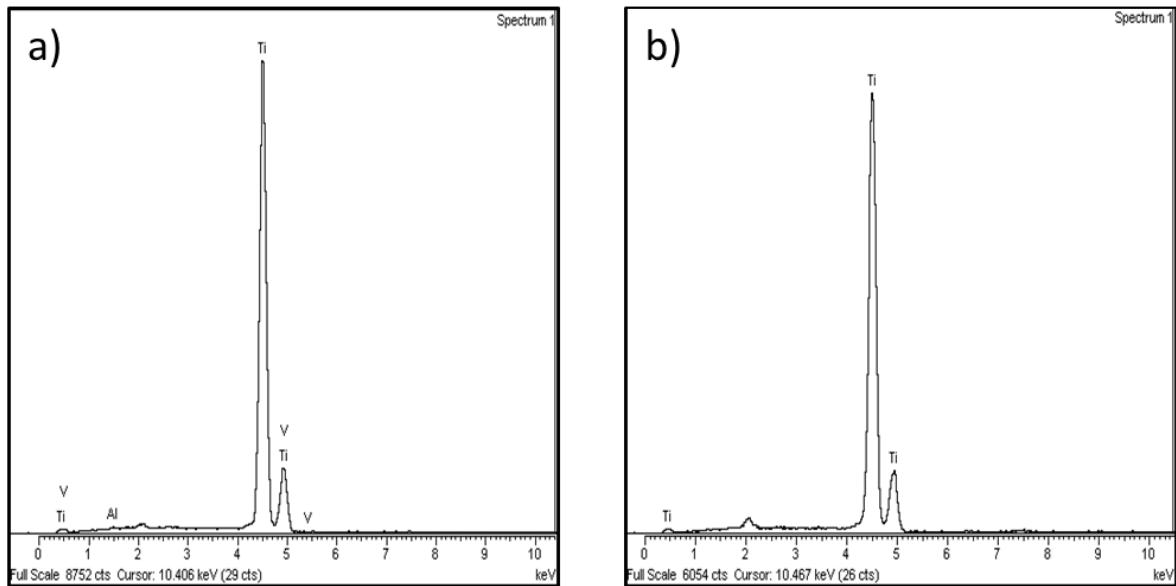


Ilustración 25. Imágenes de microscopía electrónica de las 2 muestras estudiadas.

Los análisis semi-cuantitativos de composición química de ambos polvos mediante SEM-EDS (Gráfica 2) han corroborado los valores de composición química estipulados por el proveedor y, sin presencia de elementos contaminantes en su composición.



Gráfica 2. Espectros de composición EDS del polvo Ti6Al4V (a) y Ti (b).

4.4. LIBERACIÓN DE IONES METÁLICOS

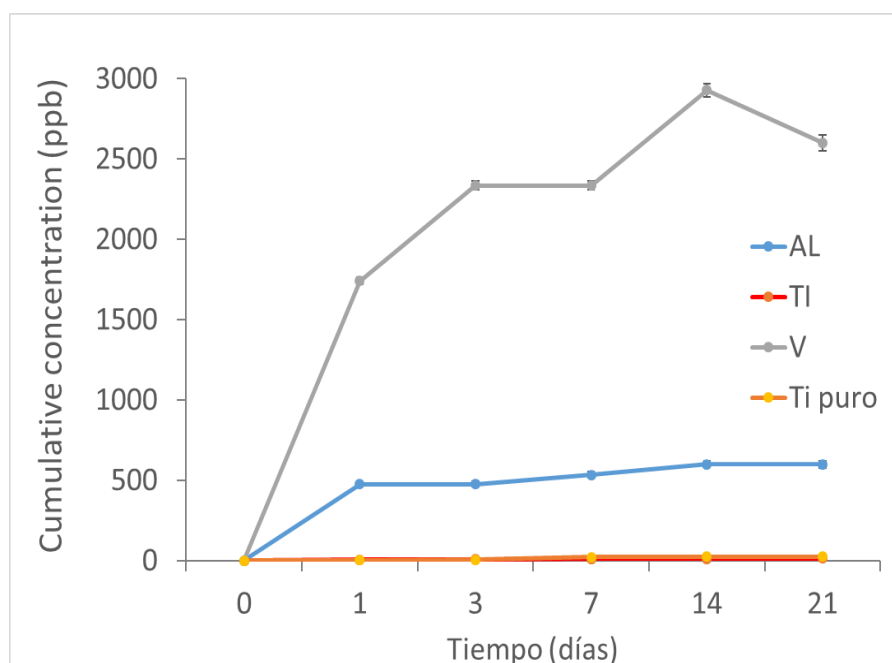
En la gráfica 3 se presentan las curvas de liberación de iones de titanio, aluminio y vanadio al medio líquido (solución de Hanks) en función del tiempo de incubación de ambos polvos evaluados.

El análisis comparativo a nivel de liberación de iones titanio ha mostrado un comportamiento similar de ambos polvos analizadas, con una etapa inicial de alta liberación de iones de titanio en los 3 primeros días de estudio, seguido de una segunda etapa de estabilización progresiva del nivel de liberación de iones de Titanio entre los 3 y 21 días de incubación.

El análisis comparativo a nivel cuantitativo de liberación de iones titanio entre ambos polvos evaluados ha mostrado diferencias entre las muestras en cuanto a la cantidad de iones en función del tiempo de

incubación. A pesar de los bajos valores de concentración de iones liberados por ambos polvos, el polvo Ti6Al4V-15µm ha liberado aproximadamente el doble de cantidad de iones Ti, lo que podría venir explicado por un efecto de par galvánico de la aleación respecto al Al y al V.

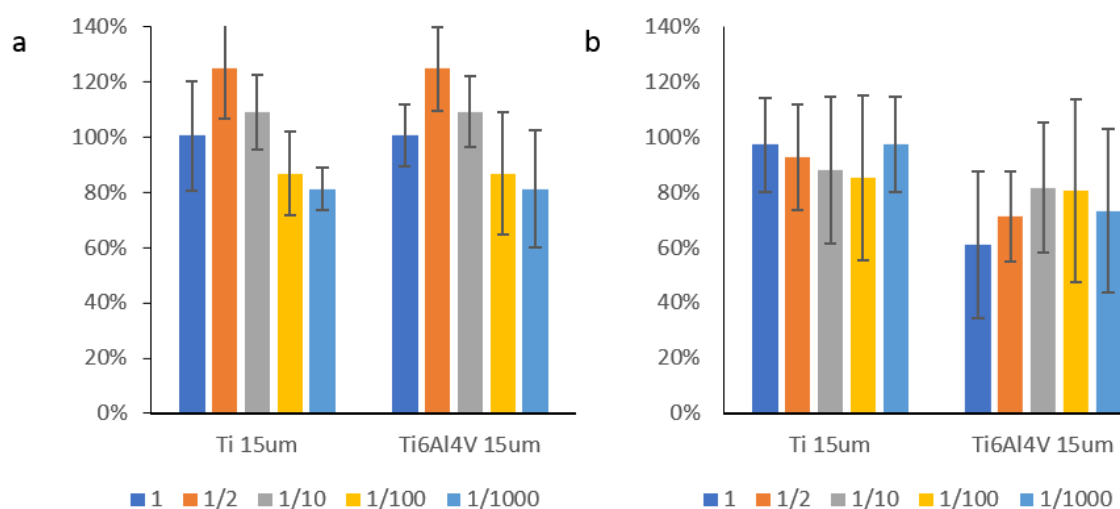
El análisis comparativo a nivel de liberación de iones entre ambos polvos ha mostrado la liberación preferencial de iones V y Al respecto al Ti del polvo Ti6Al4V. La posible influencia del efecto galvánico en la aleación de Ti6Al4V habría provocado la liberación preferencial de V y Al, comprendida entre un orden y dos órdenes de magnitud superiores respecto al Ti, respectivamente.



Gráfica 3.. Curva de liberación de iones de Ti en función del tiempo de exposición y el tipo de polvo analizar.

4.5. CITOTOXICIDAD

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad en forma de porcentaje de supervivencia celular (gráfica 4). Se establece el 70% como el límite inferior de supervivencia celular para que un material no se considere citotóxico. Las células estaban adheridas a la placa de sustrato y presentaban la morfología esperada, tanto antes como después de la incubación con los extractos.



Gráfica 4. Viabilidad celular en el ensayo de citotoxicidad de las células SAOS-1 (a) y HFF-1 (b)

Las muestras evaluadas en el ensayo de citotoxicidad han presentado valores superiores al 70% de supervivencia celular en todos los casos. Se determina que las muestras analizadas en las condiciones ensayadas no son citotóxicas para ninguna de los tipos de células estudiados.

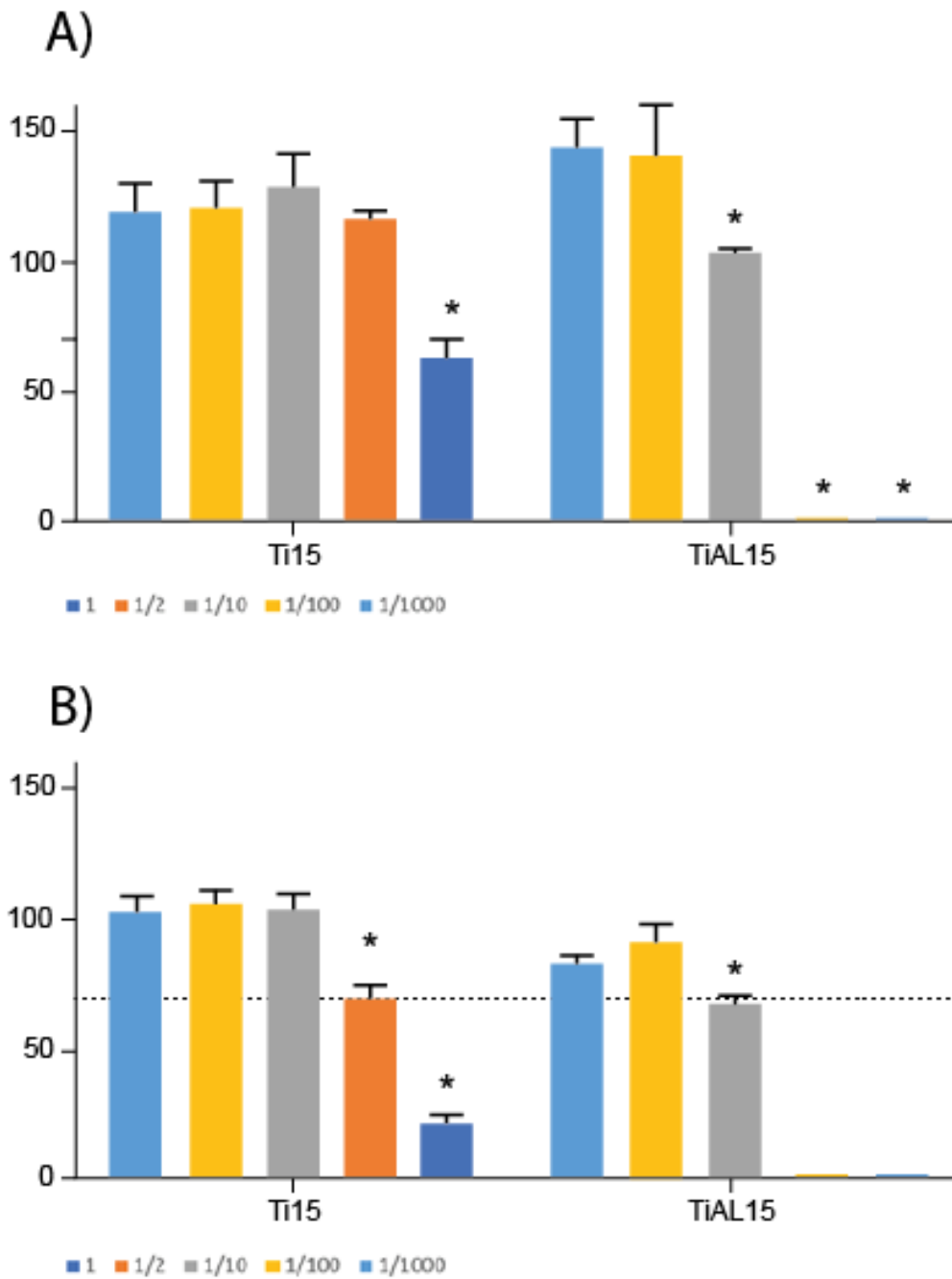
Los ensayos de citotoxicidad han mostrado valores ligeramente superiores al 80% de supervivencia celular en ambas líneas celulares evaluadas para el polvo de Ti-15 μ m. No obstante, el polvo de Ti6Al4V ha mostrado valores medios de supervivencia celular por debajo del 80% para la línea celular HFF-1. A la vista de los resultados, se confirmaría una cierta tendencia al incremento del efecto citotóxico celular sobre fibroblastos humanos (tejido gingival) de las partículas de polvo de Ti6Al4V respecto a las de titanio.

4.6. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

4.6.1. Ensayo de citotoxicidad

Se realizó el ensayo de citotoxicidad a 24 y 48 horas para evaluar la supervivencia celular. Para ello, se cultivaron las células THP-1 en medio con los extractos a diferentes concentraciones: [ISO] (0,2g / ml), y sus diluciones 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000. Siguiendo la normativa, se consideró el índice de supervivencia celular inferior a 70% como citotóxico. Las células estaban adheridas a la placa de sustrato y presentaban la morfología esperada, tanto antes como después de la incubación con los extractos.

Como se puede observar en la gráfica 5, las células con concentraciones de [ISO], y su dilución 1: 2 se consideraron citotóxicas a las 24 y 48 h, para la aleación titanio, aluminio y vanadio Ti6Al4V (TiAL15) pero no para el caso de las micropartículas de titanio (Ti15) donde únicamente se considera citotóxica la concentración [ISO]. Además, los extractos de las micropartículas de la aleación (TiAL15) también fueron citotóxicos a una dilución 1:10. Por esta razón, se utilizó la dilución 1: 100 para experimentos adicionales.



Gráfica 5. Niveles de citotoxicidad de las células THP-1 en extractos de micropartículas de Titanio (Ti15) y la aleación de titanio, aluminio y vanadio Ti6Al4V (TiAL15), realizado a 24 horas (A) y 48 horas (B).
* $p < 0,05$ vs its [ISO]/1000

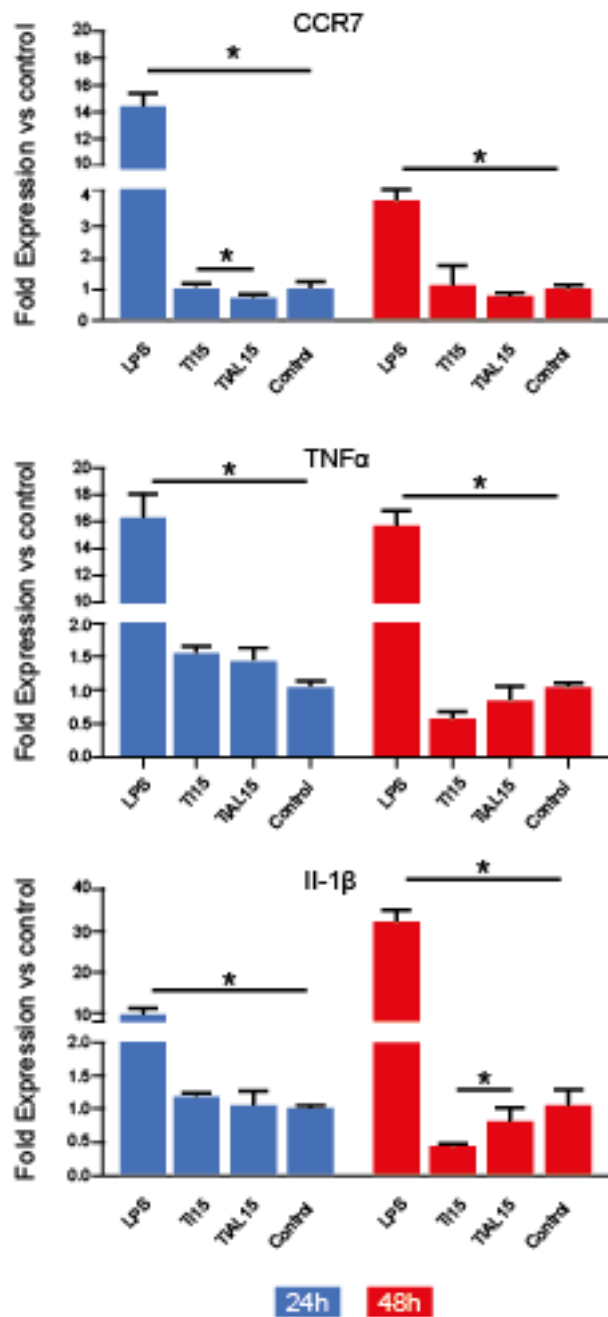
4.6.2. - Ensayo de respuesta inflamatoria

1. Análisis de expresión génica

Una vez evaluada la citotoxicidad de los extractos en el cultivo con células THP-1, se procedió al ensayo de la respuesta inflamatoria con la concentración considerada como no citotóxica. Como se puede observar en las gráficas 6 y 7, en el caso de la expresión génica, los marcadores pro-inflamatorios (CCR7, TNF α e IL-1 β) presentaron niveles similares a los de control (TCP), y éstos fueron significativamente inferiores al cultivo con el medio pro-inflamatorio LPS, control positivo de la inflamación. Específicamente, los valores de los extractos de la aleación titanio, aluminio y vanadio Ti6Al4V (TiAL15) fueron significativamente inferiores a 24 horas. En cambio, en el caso de la interleucina IL-1 β , los valores de los extractos de titanio (Ti15) fueron significativamente inferiores a 48 horas.

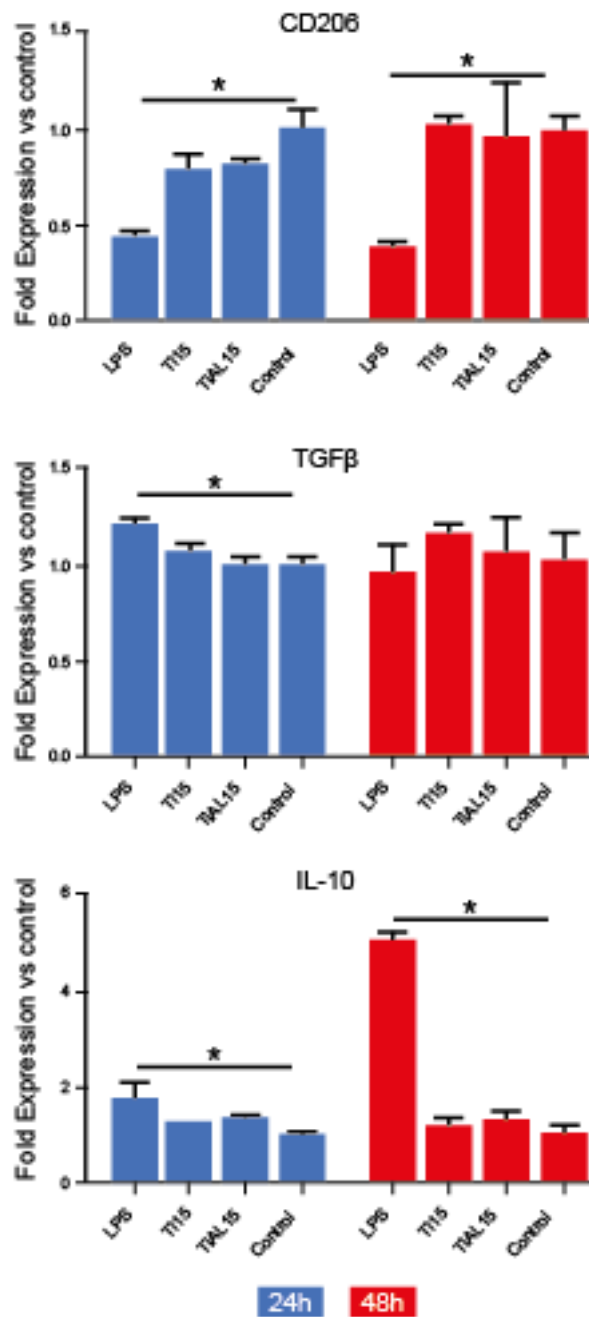
Por otro lado, los marcadores anti-inflamatorios (CD206, TGF- β e IL-10) siguieron la misma tendencia que la muestra control (TCP) ya que presentaron valores similares (Gráfica 7). Estos resultados indican que las células no muestran una respuesta inflamatoria cultivadas en medio acondicionado con las muestras.

A) Pro-inflammatory response



Gráfica 6. Análisis de RNA de la respuesta inflamatoria en células THP-1 de marcadores pro-inflamatorios (A). Células cultivadas con extractos de micropartículas de Titanio (Ti15) y la aleación de titanio, aluminio y vanadio Ti6Al4V (TiAL15).

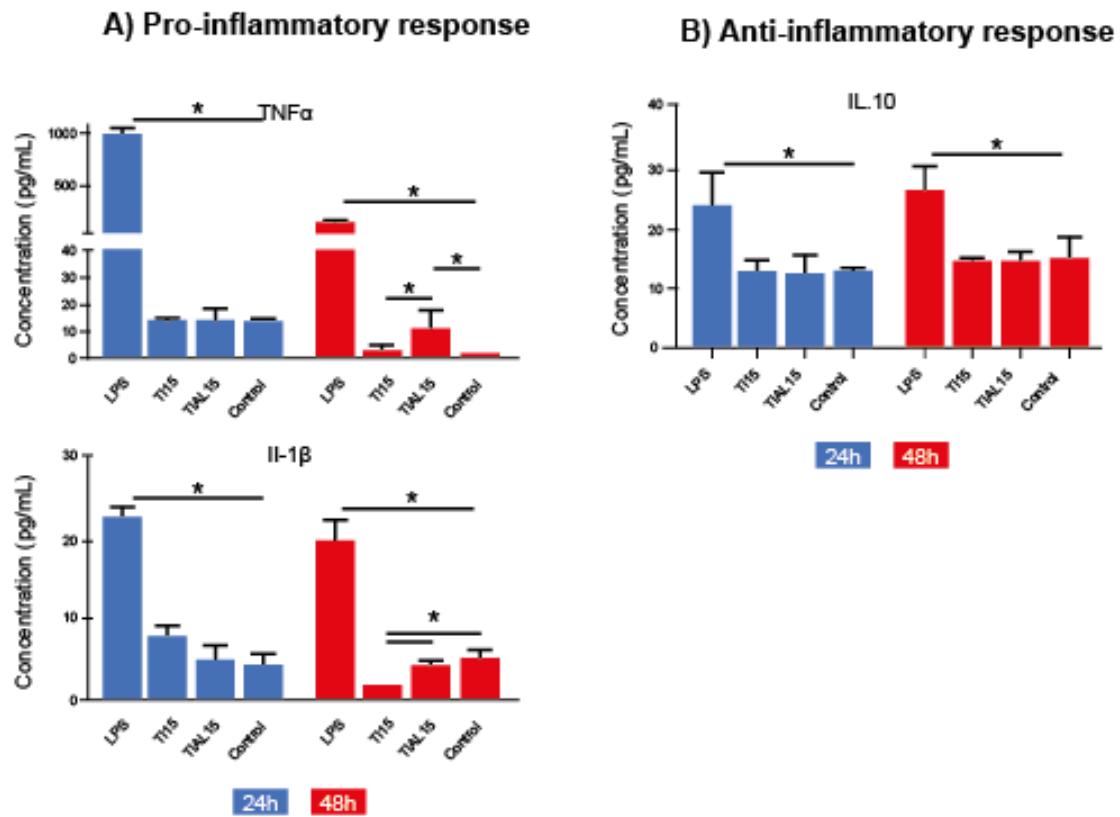
B) Anti-inflammatory response



Gráfica 7. Análisis de RNA de la respuesta inflamatoria en células THP-1 de marcadores anti inflamatorios (A). Células cultivadas con extractos de micropartículas de Titanio (Ti15) y la aleación de titanio, aluminio y vanadio Ti6Al4V (TiAL15).

2. - Análisis de expresión de proteínas

Una vez evaluada la respuesta a nivel génico, se procedió al análisis de proteínas. Se puede observar en la Gráfica 8 que los marcadores pro-inflamatorios (TNF α e IL-1 β) presentaron niveles similares a los del control (TCP), y éstos fueron significativamente inferiores al cultivo con el medio pro-inflamatorio LPS, control positivo de la inflamación. Por otro lado, el marcador analizado anti-inflamatorio (IL-10) obtuvo resultados similares a los de la muestra de control (TCP). Estos resultados indican que las células no muestran una respuesta inflamatoria cultivadas en medio acondicionado de las muestras. Además, estos resultados van en concordancia con los de la citotoxicidad, indicando que la tendencia general es que la muestra de la aleación (TiAL15) presenta una mayor toxicidad celular y una mayor respuesta pro-inflamatoria.



Gráfica 8. Análisis de proteína de la respuesta inflamatoria en células THP-1 de marcadores pro-inflamatorios (A) y anti-inflamatorios (B). Células cultivadas con extractos de micropartículas de Titanio (Ti15) y la aleación de titanio, aluminio y vanadio Ti6Al4V (TiAL15). * $p < 0,05$.

5. CONCLUSIONES

A continuación, se presentan las principales conclusiones extraídas del estudio:

1- Las muestras de Ti-15 μ m presentan unas características muy similares a las muestras de Ti6Al4V-15 μ m, sin presentar diferencias significativas en cuanto a superficie específica y valor medio de diámetro equivalente de partícula.

2- A nivel morfológico, el análisis SEM no ha mostrado grandes diferencias entre las muestras de Ti-15 μ m y Ti6Al4V-15 μ m, aunque sí parecería observarse una mayor cantidad de partículas finas en las muestras de Ti6Al4V-15 μ m. El análisis SEM ha mostrado una geometría heterogénea, con un acabado rugoso e irregular en ambos polvos evaluados, generalmente poliédrica y sin presencia de contaminantes.

Los análisis semicuantitativos de composición química de ambos polvos mediante SEM-EDS han corroborado los valores de composición química estipulados por el proveedor y, sin presencia de elementos contaminantes en su composición.

- 3-** El análisis comparativo a nivel cuantitativo de liberación de iones titanio entre ambos polvos evaluados ha mostrado diferencias entre las muestras en cuanto a la cantidad de iones en función del tiempo de incubación. A pesar de los bajos valores de concentración de iones liberados por ambos polvos, el polvo Ti6Al4V-15 μ m ha liberado aproximadamente el doble de cantidad de iones Ti, lo que podría venir explicado por un efecto de par galvánico de la aleación respecto al Al y al V. La posible influencia del efecto galvánico en la aleación de Ti6Al4V habría provocado la liberación preferencial de V y Al, comprendida entre un orden y dos órdenes de magnitud superiores respecto al Ti, respectivamente.
- 4-** Los ensayos de citotoxicidad han mostrado valores ligeramente superiores al 80% de supervivencia celular en ambas líneas celulares evaluadas para el polvo de Ti-15 μ m. No obstante, el polvo de Ti-15 μ m ha mostrado valores medios de supervivencia celular por debajo del 80% para la línea celular HFF-1. A la vista de los resultados, se confirmaría una cierta tendencia al incremento del efecto citotóxico celular sobre fibroblastos humanos (tejido gingival) de las partículas de polvo de Ti6Al4V respecto a las de titanio.

5- Según los ensayos realizados para evaluar la respuesta inflamatoria de las células THP-1 en contacto con los extractos de micropartículas de titanio de 15 μm y de distinta composición: titanio (Ti15) y una aleación de titanio, aluminio y vanadio Ti6Al4V (TiAL15) podemos concluir que:

- La supervivencia celular en los cultivos con extractos de la aleación de Ti6AL4V es inferior comparada con la de únicamente titanio (Ti15), que obtuvo un porcentaje de citotoxicidad muy superior significativamente.
- A nivel génico, las células no muestran una respuesta inflamatoria cultivadas en medio acondicionado de las muestras comparadas con el control. Aún y así, a 48 horas la aleación de Ti6AL4V presenta mayores niveles del marcador de inflamación Il-1 β comparado con la de únicamente titanio (Ti15).
- A nivel proteico, las células no muestran una respuesta inflamatoria cultivadas en medio acondicionado de las muestras comparadas con el control. Aún y así, a 48 horas la aleación de Ti6AL4V presenta mayores niveles de los marcadores de inflamación (TNF α y Il-1 β) comparado con la de únicamente titanio (Ti15). Por lo tanto, existe una tendencia que con la aleación se presenta una mayor toxicidad y una mayor respuesta pro-inflamatoria.

6. REPERCUSIONES Y RECOMENDACIONES CLÍNICAS

A la luz de los resultados, y como impacto en la clínica diaria, es interesante su análisis por diversos motivos. Los implantes dentales comercializados son de aleaciones varias, sin un consenso en cuál se comporta mejor. Tras este estudio, podemos afirmar que las partículas desprendidas de los implantes de titanio comercialmente puro, cuando son insertados en el lecho periimplantario siguiendo las recomendaciones del fabricante, tanto de fresado como de inserción, generan una menor citotoxicidad y menor respuesta inflamatoria de los tejidos periimplantarios, que las aleaciones de Ti6Al4V. Por lo tanto, se aconseja el uso de implantes de titanio comercialmente puro, siguiendo las recomendaciones de uso descritas por los fabricantes.

En un futuro, se realizarán otros estudios, siguiendo esta misma línea de investigación, con el fin de esclarecer las diferentes consecuencias que pueden provocar las partículas desprendidas de los implantes dentales:

- Estudios in vitro de la cantidad de partículas generadas, sin seguir las recomendaciones de fresado e inserción descritas por el fabricante. Aumentando los torques de inserción por encima de 50 N/cm².
- Estudios in vivo de las partículas generadas.

- Estudio de la influencia del tamaño de las partículas desprendidas.
- Estudiar las partículas desprendidas en los tratamientos de modificación de la superficie, forma y tamaño de los implantes dentales, como los procesos de implantoplastia, tratamiento mediante el cual tratamos ciertos tipos de periimplantitis.
- Estudiar la resistencia a la corrosión de dichas partículas, ya que es un dato fundamental que determinará la capacidad de dichas partículas para provocar metalosis.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. Scand J Plast Reconstr Surg. 1969;3(2):81–100.
2. Schroeder A, Pohler O, Sutter F. [Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer]. Schweizerische Monatsschrift für Zahnheilkunde = Rev Mens suisse d'odonto-stomatologie. 1976 Jul;86(7):713–27.
3. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. Scand J Plast Reconstr Surg Suppl. 1977;16:1–132.
4. Buser D, Janner SFM, Wittneben J-G, Bragger U, Ramseier CA, Salvi GE. 10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303 partially edentulous patients. Clin Implant Dent Relat Res. 2012 Dec;14(6):839–51.
5. Hjalmarsson L, Gheisarifar M, Jemt T. A systematic review of survival of single implants as presented in longitudinal studies with a follow-up of at least 10 years. Eur J Oral Implantol. 2016;9 Suppl 1:S155-62.

6. Oral implantology. Glossary of implant terms. Vol. Suppl 1, The Journal of oral implantology. United States; 2007. p. 2–14.
7. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. J Clin Periodontol. 2018 Jun;45 Suppl 2:S1–8.
8. Lee C-T, Huang Y-W, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. J Dent. 2017 Jul;62:1–12.
9. Romandini M, Lima C, Pedrinaci I, Araoz A, Soldini MC, Sanz M. Prevalence and risk/protective indicators of peri-implant diseases: A university-representative cross-sectional study. Clin Oral Implants Res. 2021 Jan;32(1):112–22.
10. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. N Engl J Med. 2006 May;354(21):2250–61.
11. Runkle JC, Pugh J. The micro-mechanics of cancellous bone. II. Determination of the elastic modulus of individual trabeculae by a buckling analysis. Bull Hosp Joint Dis. 1975 Apr;36(1):2–10.
12. Williams JL, Lewis JL. Properties and an anisotropic model of cancellous bone from the proximal tibial epiphysis. J Biomech Eng. 1982 Feb;104(1):50–6.

13. Stone JL, Beaupre GS, Hayes WC. Multiaxial strength characteristics of trabecular bone. *J Biomech.* 1983;16(9):743–52.
14. Rice JC, Cowin SC, Bowman JA. On the dependence of the elasticity and strength of cancellous bone on apparent density. *J Biomech.* 1988;21(2):155–68.
15. Martin, R.B., Burr, D.B., Sharkey, N.A., Fyhrie DP. *Skeletal Tissue Mechanics.* 2015.
16. Parfitt AM. Bone and plasma calcium homeostasis. *Bone.* 1987;8 Suppl 1:S1-8.
17. HA M. Structural Characteristics of the alveolar process. *International J Orthod.* 1926;12:722–30.
18. Devlin H, Horner K, Ledgerton D. A comparison of maxillary and mandibular bone mineral densities. *J Prosthet Dent.* 1998 Mar;79(3):323–7.
19. Turkyilmaz I, Ozan O, Yilmaz B, Ersoy AE. Determination of bone quality of 372 implant recipient sites using Hounsfield unit from computerized tomography: a clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2008 Dec;10(4):238–44.
20. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect.* 1996;45:371–86.
21. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS. Bone lining

- cells: structure and function. Scanning Microsc. 1989 Sep;3(3):951-3.
22. Frost HM. Some ABC's of skeletal pathophysiology. 6. The growth/modeling/remodeling distinction. Vol. 49, Calcified tissue international. United States; 1991. p. 301-2.
 23. Cowin SC. Wolff's law of trabecular architecture at remodeling equilibrium. J Biomech Eng. 1986 Feb;108(1):83-8.
 24. Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. Anat Rec. 1987 Sep;219(1):1-9.
 25. Wiskott HW, Belser UC. Lack of integration of smooth titanium surfaces: a working hypothesis based on strains generated in the surrounding bone. Clin Oral Implants Res. 1999 Dec;10(6):429-44.
 26. R. B. Martin, D. B. Burr and NAS. Skeletal Tissue Mechanics. New York, USA: Springer Verlag New York Inc; 1998.
 27. H. M. Frost MDS. Bone remodeling dynamics. Illinois: Charles C Thomas Company; 1963.
 28. Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 1999;13 Suppl:S101-12.
 29. Frost HM, Villanueva AR, Jaworski ZF, Meunier P, Shimizu AG. Evaluation of cellular-level haversian bone resorption in human hyperparathyroid states. A preliminary report. Henry Ford Hosp

- Med J. 1969;17(4):259–66.
30. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med*. 1998 Sep;188(5):997–1001.
 31. Aubin JE, Bonnellye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int*. 2000;11(11):905–13.
 32. Burstein AH, Currey JD, Frankel VH, Reilly DT. The ultimate properties of bone tissue: the effects of yielding. *J Biomech*. 1972 Jan;5(1):35–44.
 33. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000 Apr;21(2):115–37.
 34. Baron R, Tross R, Vignery A. Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation. *Anat Rec*. 1984 Jan;208(1):137–45.
 35. FROST HM. Observations on osteoid seams: the existence of a resting state. *Henry Ford Hosp Med Bull*. 1960 Jun;8:220–4.
 36. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem*. 1994 Jul;55(3):273–86.

37. Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res.* 1969;3(3):211–37.
38. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981 Dec;10(6):387–416.
39. Trisi P, Rao W. Bone classification: clinical-histomorphometric comparison. *Clin Oral Implants Res.* 1999 Feb;10(1):1–7.
40. Choel L, Duboeuf F, Bourgeois D, Briguet A, Lissac M. Trabecular alveolar bone in the human mandible: a dual-energy x-ray absorptiometry study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Mar;95(3):364–70.
41. Astrand P, Billstrom C, Feldmann H, Fischer K, Henricsson V, Johansson B, et al. Tapered implants in jaws with soft bone quality: a clinical and radiographic 1-year study of the Branemark System Mark IV fixture. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003;5(4):213–8.
42. Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol.* 1991 Jan;62(1):2–4.
43. Friberg B, Jemt T, Lekholm U. Early failures in 4,641 consecutively placed Branemark dental implants: a study from stage 1 surgery to the connection of completed prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1991;6(2):142–6.

44. Herrmann I, Lekholm U, Holm S, Kultje C. Evaluation of patient and implant characteristics as potential prognostic factors for oral implant failures. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(2):220–30.
45. Hutton JE, Heath MR, Chai JY, Harnett J, Jemt T, Johns RB, et al. Factors related to success and failure rates at 3-year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Branemark implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10(1):33–42.
46. Ibanez C, Catena A, Galindo-Moreno P, Noguerol B, Magan-Fernandez A, Mesa F. Relationship Between Long-Term Marginal Bone Loss and Bone Quality, Implant Width, and Surface. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016;31(2):398–405.
47. Simons W-F, De Smit M, Duyck J, Coucke W, Quirynen M. The proportion of cancellous bone as predictive factor for early marginal bone loss around implants in the posterior part of the mandible. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Sep;26(9):1051–9.
48. Derks J, Schaller D, Hakansson J, Wennstrom JL, Tomasi C, Berglundh T. Peri-implantitis - onset and pattern of progression. *J Clin Periodontol*. 2016 Apr;43(4):383–8.
49. Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implants Res*. 1996 Dec;7(4):329–36.

50. Kristensen IB, Christensen JH, Lyng MB, Moller MB, Pedersen L, Rasmussen LM, et al. Expression of osteoblast and osteoclast regulatory genes in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma: only up-regulation of Wnt inhibitors SFRP3 and DKK1 is associated with lytic bone disease. *Leuk Lymphoma*. 2014 Apr;55(4):911–9.
51. Jahani M, Genever PG, Patton RJ, Ahwal F, Fagan MJ. The effect of osteocyte apoptosis on signalling in the osteocyte and bone lining cell network: a computer simulation. *J Biomech*. 2012 Nov;45(16):2876–83.
52. Leonard Irwin Linkow; Raphael Chercheve. Theories and techniques of oral implantology. St Louis: Mosby, Incorporated; 1970.
53. Lekholm U ZG. Patient selection and preparation. Tissue integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry. Branemark PI, Zarb GA AT, editor. Chicago: Quintessence Publishing Company;
54. Misch CE. Bone character: second vital implant criterion. *Dent Today*. 1988;7:39–40.
55. Carter DR, Hayes WC. Bone compressive strength: the influence of density and strain rate. *Science*. 1976 Dec;194(4270):1174–6.
56. Mah P, Reeves TE, McDavid WD. Deriving Hounsfield units using

- grey levels in cone beam computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol.* 2010 Sep;39(6):323–35.
57. Misch CE. *Dental Implant Prosthetics*. 2^o. Misch CE, editor. Elsevier inc; 2015. 245 p.
 58. Norton MR, Gamble C. Bone classification: an objective scale of bone density using the computerized tomography scan. *Clin Oral Implants Res.* 2001 Feb;12(1):79–84.
 59. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981;52(2):155–70.
 60. Abrahamsson I, Linder E, Lang NP. Implant stability in relation to osseointegration: an experimental study in the Labrador dog. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Mar;20(3):313–8.
 61. Nedir R, Bischof M, Szmukler-Moncler S, Bernard J-P, Samson J. Predicting osseointegration by means of implant primary stability. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Oct;15(5):520–8.
 62. Sjostrom M, Lundgren S, Nilson H, Sennerby L. Monitoring of implant stability in grafted bone using resonance frequency analysis. A clinical study from implant placement to 6 months of loading. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jan;34(1):45–51.
 63. Swami V, Vijayaraghavan V, Swami V. Current trends to measure implant stability. *J Indian Prosthodont Soc.* 2016;16(2):124–30.

64. Meredith N. Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont*. 1998;11(5):491–501.
65. Schulte W, d’Hoedt B, Lukas D, Muhlbradt L, Scholz F, Bretsch J, et al. [Periotest--a new measurement process for periodontal function]. *Zahnarztl Mitt*. 1983 Jun;73(11):1229-1230,1233-1236,1239-1240.
66. Isidor F. Mobility assessment with the Periotest system in relation to histologic findings of oral implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13(3):377–83.
67. Teerlinck J, Quirynen M, Darius P, van Steenberghe D. Periotest: an objective clinical diagnosis of bone apposition toward implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991;6(1):55–61.
68. Chavez H, Ortman LF, DeFranco RL, Medige J. Assessment of oral implant mobility. *J Prosthet Dent*. 1993 Nov;70(5):421–6.
69. Aparicio C. The use of the Periotest value as the initial success criteria of an implant: 8-year report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997 Apr;17(2):150–61.
70. Evans GH, Mendez AJ, Caudill RF. Loaded and nonloaded titanium versus hydroxyapatite-coated threaded implants in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11(3):360–71.
71. Schulte W, Lukas D. Periotest to monitor osseointegration and to check the occlusion in oral implantology. *J Oral Implantol*. 1993;19(1):23–32.

72. Caulier H, Naert I, Kalk W, Jansen JA. The relationship of some histologic parameters, radiographic evaluations, and Periotest measurements of oral implants: an experimental animal study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997;12(3):380–6.
73. Haas R, Saba M, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Examination of the damping behavior of IMZ implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10(4):410–4.
74. Brizuela-Velasco A, Alvarez-Arenal A, Gil-Mur FJ, Herrero-Climent M, Chavarri-Prado D, Chento-Valiente Y, et al. Relationship Between Insertion Torque and Resonance Frequency Measurements, Performed by Resonance Frequency Analysis, in Micromobility of Dental Implants: An In Vitro Study. *Implant Dent*. 2015 Oct;24(5):607–11.
75. Trisi P, De Benedittis S, Perfetti G, Berardi D. Primary stability, insertion torque and bone density of cylindrical implant ad modum Branemark: is there a relationship? An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2011 May;22(5):567–70.
76. Ottoni JMP, Oliveira ZFL, Mansini R, Cabral AM. Correlation between placement torque and survival of single-tooth implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(5):769–76.
77. Duyck J, Corpas L, Vermeiren S, Ogawa T, Quirynen M, Vandamme K, et al. Histological, histomorphometrical, and radiological evaluation of an experimental implant design with a

- high insertion torque. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Aug;21(8):877–84.
78. Cha JY, Pereira MD, Smith AA, Houschyar KS, Yin X, Mouraret S, et al. Multiscale analyses of the bone-implant interface. *J Dent Res.* 2015 Mar;94(3):482–90.
79. Barone A, Alfonsi F, Derchi G, Tonelli P, Toti P, Marchionni S, et al. The Effect of Insertion Torque on the Clinical Outcome of Single Implants: A Randomized Clinical Trial. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016 Jun;18(3):588–600.
80. Khayat PG, Arnal HM, Tourbah BI, Sennerby L. Clinical outcome of dental implants placed with high insertion torques (up to 176 Ncm). *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013 Apr;15(2):227–33.
81. Norton MR. The Influence of Low Insertion Torque on Primary Stability, Implant Survival, and Maintenance of Marginal Bone Levels: A Closed-Cohort Prospective Study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2017;32(4):849–57.
82. Degidi M, Daprile G, Piattelli A. Implants inserted with low insertion torque values for intraoral welded full-arch prosthesis: 1-year follow-up. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012 May;14 Suppl 1:e39-45.
83. Toljanic JA, Baer RA, Ekstrand K, Thor A. Implant rehabilitation of the atrophic edentulous maxilla including immediate fixed provisional restoration without the use of bone grafting: a review

- of 1-year outcome data from a long-term prospective clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(3):518–26.
84. Meredith N, Alleyne D, Cawley P. Quantitative determination of the stability of the implant-tissue interface using resonance frequency analysis. *Clin Oral Implants Res*. 1996 Sep;7(3):261–7.
85. Xiao J, Li Y-Q, Guan S-M, Kong L, Liu B, Li D. Effects of lateral cortical anchorage on the primary stability of implants subjected to controlled loads: an in vitro study. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Mar;50(2):161–5.
86. Brizuela-Velasco A, Chavarri-Prado D. The functional loading of implants increases their stability: A retrospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019 Feb;21(1):122–9.
87. Valderrama P, Oates TW, Jones AA, Simpson J, Schoolfield JD, Cochran DL. Evaluation of two different resonance frequency devices to detect implant stability: a clinical trial. *J Periodontol*. 2007 Feb;78(2):262–72.
88. Fischer K, Backstrom M, Sennerby L. Immediate and early loading of oxidized tapered implants in the partially edentulous maxilla: a 1-year prospective clinical, radiographic, and resonance frequency analysis study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009 Jun;11(2):69–80.
89. Simunek A, Kopecka D, Brazda T, Strnad I, Capek L, Slezak R.

- Development of implant stability during early healing of immediately loaded implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012;27(3):619–27.
90. Pagliani L, Sennerby L, Petersson A, Verrocchi D, Volpe S, Andersson P. The relationship between resonance frequency analysis (RFA) and lateral displacement of dental implants: an in vitro study. *J Oral Rehabil*. 2013 Mar;40(3):221–7.
 91. Aparicio C, Gil FJ, Planell JA, Engel E. Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Dec;13(12):1105–11.
 92. Gil-Mur FJ. Avances tecnológicos en implantología oral: hacia los implantes dentales inteligentes. *Graficas R*. Barcelona; 2018. 100–110 p.
 93. Mitsuo Niinomi. Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods. Elsevier inc; 2003.
 94. Kozlovsky A, Tal H, Laufer B-Z, Leshem R, Rohrer MD, Weinreb M, et al. Impact of implant overloading on the peri-implant bone in inflamed and non-inflamed peri-implant mucosa. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Oct;18(5):601–10.
 95. Lee TJ, Ueno T, Nomura N, Wakabayashi N, Hanawa T. Titanium-Zirconium Binary Alloy as Dental Implant Material: Analysis of the

- Influence of Compositional Change on Mechanical Properties and In Vitro Biologic Response. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016;31(3):547–54.
96. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*. 1999 Jan;20(1):1–25.
 97. Perez-Pevida E, Brizuela-Velasco A, Chavarri-Prado D, Jimenez-Garrudo A, Sanchez-Lasheras F, Solaberrieta-Mendez E, et al. Biomechanical Consequences of the Elastic Properties of Dental Implant Alloys on the Supporting Bone: Finite Element Analysis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1850401.
 98. Karre R, Niranjana MK, Dey SR. First principles theoretical investigations of low Young's modulus beta Ti-Nb and Ti-Nb-Zr alloys compositions for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015 May;50:52–8.
 99. Park CH, Lee CS, Kim Y-J, Jang J-H, Suh J-Y, Park J-W. Improved pre-osteoblast response and mechanical compatibility of ultrafine-grained Ti-13Nb-13Zr alloy. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Jul;22(7):735–42.
 100. Coelho PG, Granato R, Marin C, Teixeira HS, Suzuki M, Valverde GB, et al. The effect of different implant macrogeometries and surface treatment in early biomechanical fixation: an experimental study in dogs. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011 Nov;4(8):1974–81.

101. Deporter D. Dental implant design and optimal treatment outcomes. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2009 Dec;29(6):625–33.
102. Irinakis T, Wiebe C. Initial torque stability of a new bone condensing dental implant. A cohort study of 140 consecutively placed implants. *J Oral Implantol.* 2009;35(6):277–82.
103. O’Sullivan D, Sennerby L, Meredith N. Influence of implant taper on the primary and secondary stability of osseointegrated titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Aug;15(4):474–80.
104. Javed F, Romanos GE. The role of primary stability for successful immediate loading of dental implants. A literature review. *J Dent.* 2010 Aug;38(8):612–20.
105. Kim Y-K, Lee J-H, Lee J-Y, Yi Y-J. A randomized controlled clinical trial of two types of tapered implants on immediate loading in the posterior maxilla and mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(6):1602–11.
106. Herrero-Climent M, Lopez-Jarana P, Lemos BF, Gil FJ, Falcao C, Rios-Santos J V, et al. Relevant Design Aspects to Improve the Stability of Titanium Dental Implants. *Mater (Basel, Switzerland).* 2020 Apr;13(8).
107. Elias CN, Rocha FA, Nascimento AL, Coelho PG. Influence of implant shape, surface morphology, surgical technique and bone

- quality on the primary stability of dental implants. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012 Dec;16:169–80.
108. Boggan RS, Strong JT, Misch CE, Bidez MW. Influence of hex geometry and prosthetic table width on static and fatigue strength of dental implants. *J Prosthet Dent.* 1999 Oct;82(4):436–40.
109. Orsini E, Salgarello S, Bubalo M, Lazic Z, Trire A, Martini D, et al. Histomorphometric evaluation of implant design as a key factor in peri-implant bone response: a preliminary study in a dog model. *Minerva Stomatol.* 2009 Jun;58(6):263–75.
110. Orsini E, Giavaresi G, Trire A, Ottani V, Salgarello S. Dental implant thread pitch and its influence on the osseointegration process: an in vivo comparison study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2012;27(2):383–92.
111. Steigenga J, Al-Shammari K, Misch C, Nociti FHJ, Wang H-L. Effects of implant thread geometry on percentage of osseointegration and resistance to reverse torque in the tibia of rabbits. *J Periodontol.* 2004 Sep;75(9):1233–41.
112. Abuhussein H, Pagni G, Rebaudi A, Wang H-L. The effect of thread pattern upon implant osseointegration. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Feb;21(2):129–36.
113. Hansson S, Werke M. The implant thread as a retention element in cortical bone: the effect of thread size and thread profile: a

- finite element study. *J Biomech.* 2003 Sep;36(9):1247–58.
114. Davila E, Ortiz-Hernandez M, Perez RA, Herrero-Climent M, Cerrolaza M, Gil FJ. Crestal module design optimization of dental implants: finite element analysis and in vivo studies. *J Mater Sci Mater Med.* 2019 Jul;30(8):90.
115. Abrahamsson I, Berglundh T. Tissue characteristics at microthreaded implants: an experimental study in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2006;8(3):107–13.
116. Lee D-W, Choi Y-S, Park K-H, Kim C-S, Moon I-S. Effect of microthread on the maintenance of marginal bone level: a 3-year prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Aug;18(4):465–70.
117. Bratu EA, Tandlich M, Shapira L. A rough surface implant neck with microthreads reduces the amount of marginal bone loss: a prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Aug;20(8):827–32.
118. Khorsand A, Rasouli-Ghahroudi AA, Naddafpour N, Shayesteh YS, Khojasteh A. Effect of Microthread Design on Marginal Bone Level Around Dental Implants Placed in Fresh Extraction Sockets. *Implant Dent.* 2016 Feb;25(1):90–6.
119. Soskolne WA, Cohen S, Sennerby L, Wennerberg A, Shapira L. The effect of titanium surface roughness on the adhesion of monocytes and their secretion of TNF-alpha and PGE2. *Clin Oral*

- Implants Res. 2002 Feb;13(1):86–93.
120. Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP, et al. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1999 May;45(2):75–83.
 121. Abron A, Hopfensperger M, Thompson J, Cooper LF. Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *J Prosthet Dent.* 2001 Jan;85(1):40–6.
 122. Novaes ABJ, Souza SLS, de Oliveira PT, Souza AMMS. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(3):377–83.
 123. Ong JL, Carnes DL, Cardenas HL, Cavin R. Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblast cells in vitro. *Implant Dent.* 1997;6(1):19–24.
 124. Lahens B, Neiva R, Tovar N, Alifarag AM, Jimbo R, Bonfante EA, et al. Biomechanical and histologic basis of osseodensification drilling for endosteal implant placement in low density bone. An experimental study in sheep. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016 Oct;63:56–65.

125. Jimbo R, Tovar N, Marin C, Teixeira HS, Anchieta RB, Silveira LM, et al. The impact of a modified cutting flute implant design on osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Jul;43(7):883–8.
126. Huwais S, Meyer EG. A Novel Osseous Densification Approach in Implant Osteotomy Preparation to Increase Biomechanical Primary Stability, Bone Mineral Density, and Bone-to-Implant Contact. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017;32(1):27–36.
127. Jimbo R, Tovar N, Yoo DY, Janal MN, Anchieta RB, Coelho PG. The effect of different surgical drilling procedures on full laser-etched microgrooves surface-treated implants: an experimental study in sheep. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Sep;25(9):1072–7.
128. Galli S, Jimbo R, Tovar N, Yoo DY, Anchieta RB, Yamaguchi S, et al. The effect of osteotomy dimension on osseointegration to resorbable media-treated implants: a study in the sheep. *J Biomater Appl*. 2015 Mar;29(8):1068–74.
129. Yoo D, Tovar N, Jimbo R, Marin C, Anchieta RB, Machado LS, et al. Increased osseointegration effect of bone morphogenetic protein 2 on dental implants: an in vivo study. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Jun;102(6):1921–7.
130. Attanasio F, Antonelli A, Brancaccio Y, Averta F, Figliuzzi MM, Fortunato L, et al. Primary Stability of Three Different Osteotomy Techniques in Medullary Bone: An in Vitro Study. *Dent J*. 2020

Feb;8(1).

131. Pérez-Pevida E, Brizuela-Velasco A, Chávarri-Prado D, Diéguez-Pereira M, Jiménez-Garrudo A, Montalbán-Vadillo O, et al. Influence of time on primary stability of dental implants placed with osteotomes due to the elastic properties of peri-implant bone. *J Dent Sci.* 2019 Dec;14(4):358–64.
132. Campos FE, Gomes JB, Marin C, Teixeira HS, Suzuki M, Witek L, et al. Effect of drilling dimension on implant placement torque and early osseointegration stages: an experimental study in dogs. *J oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2012 Jan;70(1):e43-50.
133. Coelho PG, Marin C, Teixeira HS, Campos FE, Gomes JB, Guastaldi F, et al. Biomechanical evaluation of undersized drilling on implant biomechanical stability at early implantation times. *J oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2013 Feb;71(2):e69-75.
134. Stocchero M, Toia M, Cecchinato D, Becktor JP, Coelho PG, Jimbo R. Biomechanical, Biologic, and Clinical Outcomes of Undersized Implant Surgical Preparation: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2016;31(6):1247–63.
135. Tengvall P, Lundström I. Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. *Clin Mater.* 1992;9(2):115–34.
136. Cadosch D, Sutanto M, Chan E, Mhawi A, Gautschi OP, von

- Katterfeld B, et al. Titanium uptake, induction of RANK-L expression, and enhanced proliferation of human T-lymphocytes. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2010 Mar;28(3):341–7.
137. Liu R, Lei T, Dusevich V, Yao X, Liu Y, Walker MP, et al. Surface characteristics and cell adhesion: a comparative study of four commercial dental implants. *J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont.* 2013 Dec;22(8):641–51.
138. Nishimura K, Kato T, Ito T, Oda T, Sekine H, Yoshinari M, et al. Influence of titanium ions on cytokine levels of murine splenocytes stimulated with periodontopathic bacterial lipopolysaccharide. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29(2):472–7.
139. Pettersson M, Kelk P, Belibasakis GN, Bylund D, Molin Thorén M, Johansson A. Titanium ions form particles that activate and execute interleukin-1 β release from lipopolysaccharide-primed macrophages. *J Periodontal Res.* 2017 Feb;52(1):21–32.
140. Pettersson M, Pettersson J, Molin Thorén M, Johansson A. Release of titanium after insertion of dental implants with different surface characteristics - an ex vivo animal study. *Acta Biomater Odontol Scand.* 2017;3(1):63–73.
141. Okazaki Y, Gotoh E, Manabe T, Kobayashi K. Comparison of metal concentrations in rat tibia tissues with various metallic implants. *Biomaterials.* 2004 Dec;25(28):5913–20.

142. Jacobs JJ, Skipor AK, Patterson LM, Hallab NJ, Paprosky WG, Black J, et al. Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty. A prospective, controlled, longitudinal study. *J Bone Joint Surg Am*. 1998 Oct;80(10):1447–58.
143. Gallo J, Kamínek P, Tichá V, Riháková P, Ditmar R. Particle disease. A comprehensive theory of periprosthetic osteolysis: a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky, Olomouc, Czechoslov*. 2002 Dec;146(2):21–8.
144. Mu Y, Kobayashi T, Sumita M, Yamamoto A, Hanawa T. Metal ion release from titanium with active oxygen species generated by rat macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res*. 2000 Feb;49(2):238–43.
145. Noguti J, de Oliveira F, Peres RC, Renno ACM, Ribeiro DA. The role of fluoride on the process of titanium corrosion in oral cavity. *Biometals an Int J role Met ions Biol Biochem Med*. 2012 Oct;25(5):859–62.
146. Suárez-López Del Amo F, Rudek I, Wagner VP, Martins MD, O'Valle F, Galindo-Moreno P, et al. Titanium Activates the DNA Damage Response Pathway in Oral Epithelial Cells: A Pilot Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017;32(6):1413–20.
147. Obando-Pereda GA, Fischer L, Stach-Machado DR. Titanium and zirconia particle-induced pro-inflammatory gene expression in cultured macrophages and osteolysis, inflammatory hyperalgesia

- and edema in vivo. *Life Sci.* 2014 Mar;97(2):96–106.
148. Tsutsui T, Kawaguchi H, Fujino A, Sakai A, Kaji H, Nakamura T. Exposure of macrophage-like cells to titanium particles does not affect bone resorption, but inhibits bone formation. *J Orthop Sci Off J Japanese Orthop Assoc.* 1999;4(1):32–8.
149. O’Neill SC, Queally JM, Devitt BM, Doran PP, O’Byrne JM. The role of osteoblasts in peri-prosthetic osteolysis. *Bone Joint J.* 2013 Aug;95-B(8):1022–6.
150. Blum K, Wiest W, Fella C, Balles A, Dittmann J, Rack A, et al. Fatigue induced changes in conical implant-abutment connections. *Dent Mater.* 2015 Nov;31(11):1415–26.
151. Flatebø RS, Høl PJ, Leknes KN, Kosler J, Lie SA, Gjerdet NR. Mapping of titanium particles in peri-implant oral mucosa by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and high-resolution optical darkfield microscopy. *J oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* 2011 May;40(5):412–20.
152. Halperin-Sternfeld M, Sabo E, Akrish S. The Pathogenesis of Implant-Related Reactive Lesions: A Clinical, Histologic and Polarized Light Microscopy Study. *J Periodontol.* 2016 May;87(5):502–10.
153. He X, Reichl F-X, Wang Y, Michalke B, Milz S, Yang Y, et al. Analysis of titanium and other metals in human jawbones with

- dental implants - A case series study. *Dent Mater.* 2016 Aug;32(8):1042–51.
154. Ruger M, Gensior TJ, Herren C, von Walter M, Ocklenburg C, Marx R, et al. The removal of Al₂O₃ particles from grit-blasted titanium implant surfaces: effects on biocompatibility, osseointegration and interface strength in vivo. *Acta Biomater.* 2010 Jul;6(7):2852–61.
155. Mata A, Su X, Fleischman AJ, Roy S, Banks BA, Miller SK, et al. Osteoblast attachment to a textured surface in the absence of exogenous adhesion proteins. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2003 Dec;2(4):287–94.
156. Choi JW, Heo SJ, Koak JY, Kim SK, Lim YJ, Kim SH, et al. Biological responses of anodized titanium implants under different current voltages. *J Oral Rehabil.* 2006 Dec;33(12):889–97.
157. Mints D, Elias C, Funkenbusch P, Meirelles L. Integrity of implant surface modifications after insertion. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29(1):97–104.
158. Senna P, Antoninha Del Bel Cury A, Kates S, Meirelles L. Surface Damage on Dental Implants with Release of Loose Particles after Insertion into Bone. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015 Aug;17(4):681–92.
159. Sridhar S, Wilson TGJ, Valderrama P, Watkins-Curry P, Chan JY, Rodrigues DC. In Vitro Evaluation of Titanium Exfoliation During

Simulated Surgical Insertion of Dental Implants. *J Oral Implantol.*
2016 Feb;42(1):34–40.

160. Delgado-Ruiz R, Romanos G. Potential Causes of Titanium Particle and Ion Release in Implant Dentistry: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov;19(11).

8. ANEXOS.

Se muestran los resultados gráficas obtenidos en el análisis de la superficie específica.



ASAP 2020 V3.01 H

Unit 1

Serial #: 769

Page 1

Sample: m1_ti6al4v 21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M1TI64.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31	Analysis Adsorptive: N2
Completed: 21/07/2020 22:16:37	Analysis Bath Temp.: 77.414 K
Report Time: 23/07/2020 8:30:54	Thermal Correction: No
Sample Mass: 4.1944 g	Warm Free Space: 15.8506 cm ³ Measured
Cold Free Space: 46.6703 cm ³	Equilibration Interval: 10 s
Low Pressure Dose: None	Automatic Degas: Yes

Summary Report

Surface Area

Single point surface area at P/Po = 0.211558676: 0.4063 m²/g

BET Surface Area: 0.4401 m²/g

t-Plot External Surface Area: 0.4679 m²/g

BJH Adsorption cumulative surface area of pores
between 1.7000 nm and 300.0000 nm diameter: 0.344 m²/g

BJH Desorption cumulative surface area of pores
between 1.7000 nm and 300.0000 nm diameter: 0.4729 m²/g

Pore Volume

t-Plot micropore volume: -0.000026 cm³/g

BJH Adsorption cumulative volume of pores
between 1.7000 nm and 300.0000 nm diameter: 0.002176 cm³/g

BJH Desorption cumulative volume of pores
between 1.7000 nm and 300.0000 nm diameter: 0.002908 cm³/g

Pore Size

BJH Adsorption average pore diameter (4V/A): 25.3153 nm

BJH Desorption average pore diameter (4V/A): 24.5932 nm

Sample: m1_t16a4v 21_07_2020
 Operator:
 Submitter:
 File: C:\2020\DATA\M1T164.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31 Analysis Adsorptive: N2
 Completed: 21/07/2020 22:16:37 Analysis Bath Temp.: 77.414 K
 Report Time: 23/07/2020 8:30:54 Thermal Correction: No
 Sample Mass: 4.1944 g Warm Free Space: 15.8506 cm³ Measured
 Cold Free Space: 46.6703 cm³ Equilibration Interval: 10 s
 Low Pressure Dose: None Automatic Degas: Yes

Isotherm Tabular Report

Relative Pressure (P/Po)	Absolute Pressure (mmHg)	Quantity Adsorbed (cm ³ /g STP)	Elapsed Time (h:min)	Saturation Pressure (mmHg)
			00:55	765.937134
0.009828938	7.527125	0.0441	01:20	
0.039658079	30.370066	0.0694	01:23	
0.068962850	52.810905	0.0834	01:25	
0.085601419	65.551239	0.0893	01:28	
0.110621475	84.709816	0.0971	01:30	
0.135562267	103.807213	0.1032	01:32	
0.161202412	123.438805	0.1086	01:35	
0.185750443	142.234314	0.1136	01:37	
0.211558676	161.994293	0.1184	01:39	
0.236063373	180.755630	0.1224	01:41	
0.261841983	200.491913	0.1272	01:43	
0.286160647	219.109818	0.1310	01:45	
0.312094025	238.962036	0.1355	01:48	
0.337279145	258.242249	0.1397	01:50	
0.362315929	277.408386	0.1438	01:52	
0.387318258	296.545715	0.1482	01:55	
0.412648638	315.935516	0.1523	01:57	
0.437668450	335.087036	0.1566	01:59	
0.462831454	354.347687	0.1609	02:01	
0.487944250	373.569397	0.1655	02:03	
0.513145424	392.855713	0.1703	02:06	
0.538317771	412.121887	0.1753	02:08	
0.563250559	431.204163	0.1809	02:10	
0.588471132	450.506256	0.1866	02:12	
0.613650823	469.776550	0.1930	02:14	
0.638930641	489.119812	0.1999	02:17	
0.664088805	508.372498	0.2076	02:19	
0.689191333	527.582092	0.2157	02:21	
0.714224668	546.738220	0.2250	02:23	
0.739397551	566.000671	0.2353	02:25	
0.764454387	585.169983	0.2471	02:28	
0.789706963	604.492310	0.2616	02:30	
0.814873842	623.748535	0.2786	02:32	
0.840051023	643.012146	0.3002	02:34	
0.865000167	662.100708	0.3272	02:36	
0.890168579	681.352173	0.3633	02:39	
0.915167111	700.477417	0.4141	02:41	
0.928148563	710.404297	0.4524	02:43	
0.940639687	719.955627	0.5007	02:45	
0.952962397	729.377808	0.5649	02:47	
0.965204703	738.733398	0.6593	02:50	
0.974201981	745.605042	0.7682	02:53	
0.982779807	752.155396	0.9299	02:56	
			02:58	765.324646
0.987604850	755.838501	1.0815	03:01	
0.991527489	758.840820	1.2494	03:05	

Sample: m1_t16al4v 21_07_2020
 Operator:
 Submitter:
 File: C:\2020\DATA\M1T164.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31
 Completed: 21/07/2020 22:16:37
 Report Time: 23/07/2020 8:30:54
 Sample Mass: 4.1944 g
 Cold Free Space: 46.6703 cm³
 Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
 Analysis Bath Temp.: 77.414 K
 Thermal Correction: No
 Warm Free Space: 15.8506 cm³ Measured
 Equilibration Interval: 10 s
 Automatic Degas: Yes

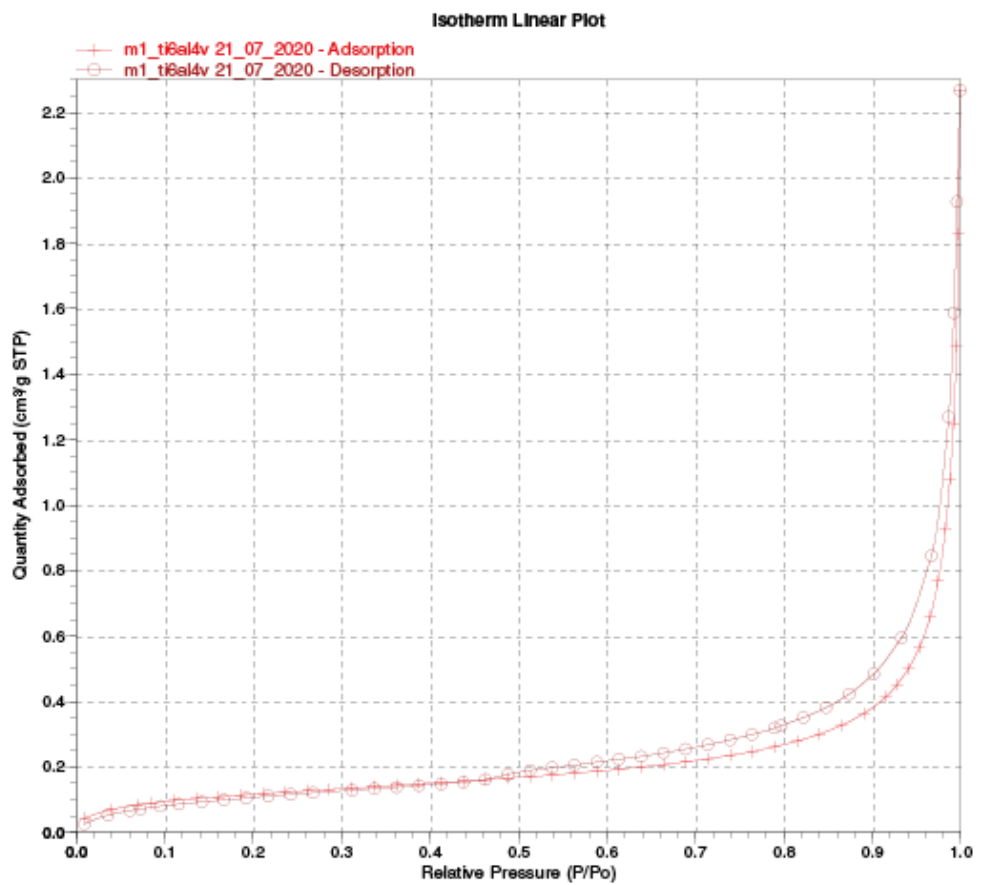
Isotherm Tabular Report

Relative Pressure (P/Po)	Absolute Pressure (mmHg)	Quantity Adsorbed (cm ³ g STP)	Elapsed Time (h:min)	Saturation Pressure (mmHg)
0.994720094	761.284485	1.4861	03:10	
0.996930836	762.976990	1.8276	03:20	
0.998912137	764.493958	2.2678	03:31	
0.995628268	761.980896	1.9271	03:34	
0.991866235	759.102051	1.5874	03:40	
0.986025744	754.632446	1.2694	03:45	
0.966563855	739.737854	0.8451	03:50	
0.932631910	713.769165	0.5946	03:54	
0.901132624	689.661987	0.4839	03:56	
0.873738510	668.696655	0.4227	03:59	
0.847700943	648.769470	0.3815	04:01	
0.822047542	629.136292	0.3508	04:03	
0.796683104	609.724304	0.3258	04:06	
0.789504983	604.230774	0.3186	04:08	
0.783900172	584.634766	0.2990	04:10	
0.739171210	565.709106	0.2826	04:13	
0.713935420	546.395508	0.2676	04:15	
0.688788240	527.149719	0.2543	04:17	
0.663551508	507.835388	0.2426	04:19	
0.638479898	488.647461	0.2316	04:22	
0.613250999	469.339111	0.2234	04:24	
0.588493789	450.391754	0.2145	04:26	
0.563039411	430.910828	0.2055	04:28	
0.537988695	411.738861	0.1975	04:31	
0.512969092	392.590668	0.1896	04:33	
0.487918194	373.418518	0.1769	04:35	
0.462397695	353.886963	0.1615	04:37	
0.437513138	334.842133	0.1533	04:40	
0.412580932	315.760803	0.1478	04:42	
0.387337720	296.441467	0.1427	04:45	
0.362271591	277.257629	0.1380	04:47	
0.337115033	258.004578	0.1334	04:49	
0.311884455	238.694870	0.1286	04:51	
0.287671014	204.856979	0.1210	04:53	
0.242402335	185.518112	0.1159	04:56	
0.217230918	166.253662	0.1109	04:58	
			05:00	765.331604
0.192188385	147.087845	0.1049	05:03	
0.166995147	127.806864	0.0990	05:05	
0.141976441	108.659058	0.0931	05:07	
0.116032776	88.803551	0.0862	05:09	
0.094761740	72.524155	0.0795	05:11	
0.072600535	55.563484	0.0714	05:13	
0.060854345	48.573753	0.0663	05:16	
0.035860893	27.445475	0.0524	05:19	
0.009102397	6.966352	0.0253	05:24	

Sample: m1_ti6al4v 21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M1TI64.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31
Completed: 21/07/2020 22:16:37
Report Time: 23/07/2020 8:30:54
Sample Mass: 4.1944 g
Cold Free Space: 46.6703 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
Analysis Bath Temp.: 77.414 K
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 15.8506 cm³ Measured
Equilibration Interval: 10 s
Automatic Degas: Yes



Sample: m1_t16a4v 21_07_2020
 Operator:
 Submitter:
 File: C:\2020\DATA\M1T164.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31
 Completed: 21/07/2020 22:16:37
 Report Time: 23/07/2020 8:30:54
 Sample Mass: 4.1944 g
 Cold Free Space: 46.6703 cm³
 Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
 Analysis Bath Temp.: 77.414 K
 Thermal Correction: No
 Warm Free Space: 15.8506 cm³ Measured
 Equilibration Interval: 10 s
 Automatic Degas: Yes

BET Surface Area Report

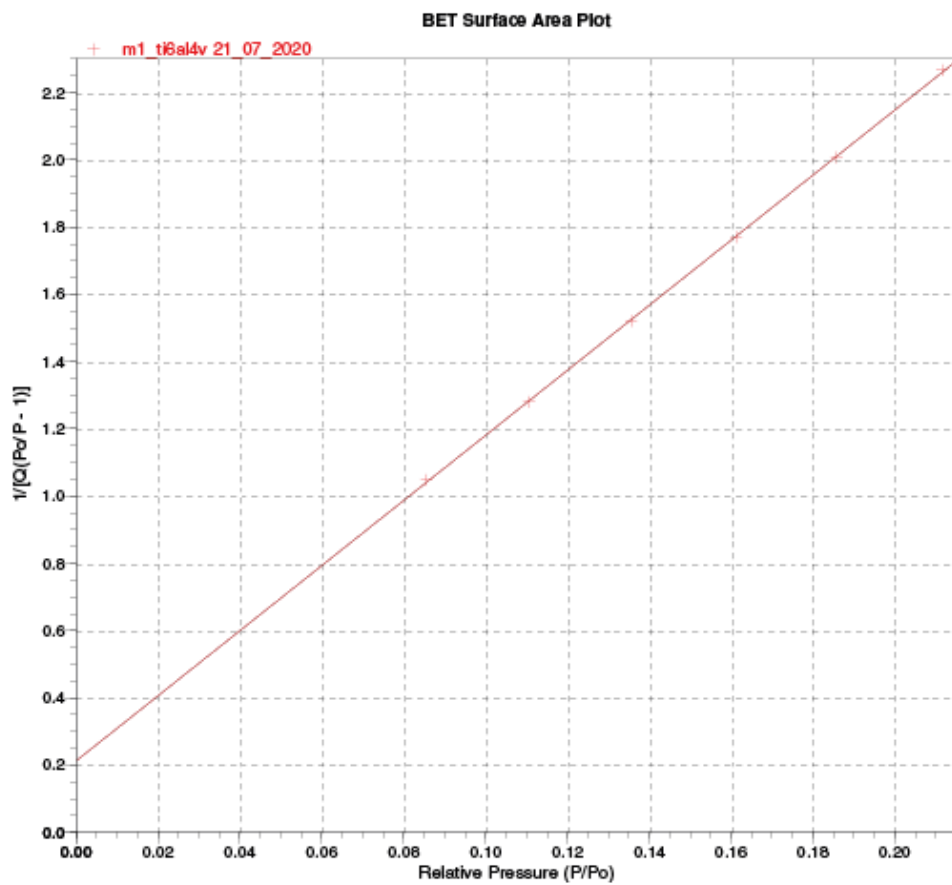
BET Surface Area: 0.4401 ± 0.0025 m²/g
 Slope: 9.678764 ± 0.055497 g/cm³ STP
 Y-Intercept: 0.212624 ± 0.008573 g/cm³ STP
 C: 46.520859
 Qm: 0.1011 cm³/g STP
 Correlation Coefficient: 0.9999343
 Molecular Cross-Sectional Area: 0.1620 nm²

Relative Pressure (P/P ₀)	Quantity Adsorbed (cm ³ /g STP)	1/[Q(P ₀ /P - 1)]
0.085601419	0.0893	1.047996
0.110621475	0.0971	1.280325
0.135562287	0.1032	1.520114
0.161202412	0.1086	1.770237
0.185750443	0.1136	2.007267
0.211558676	0.1184	2.266774

Sample: m1_ti6al4v 21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M1TI64.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31
Completed: 21/07/2020 22:16:37
Report Time: 23/07/2020 8:30:54
Sample Mass: 4.1944 g
Cold Free Space: 46.6703 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
Analysis Bath Temp.: 77.414 K
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 15.8506 cm³ Measured
Equilibration Interval: 10 s
Automatic Degas: Yes



Sample: m1_ti6al4v 21_07_2020
 Operator:
 Submitter:
 File: C:\2020\DATA\M1TI64.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31 Analysis Adsorptive: N2
 Completed: 21/07/2020 22:16:37 Analysis Bath Temp.: 77.414 K
 Report Time: 23/07/2020 8:30:54 Thermal Correction: No
 Sample Mass: 4.1944 g Warm Free Space: 15.8506 cm³ Measured
 Cold Free Space: 46.6703 cm³ Equilibration Interval: 10 s
 Low Pressure Dose: None Automatic Degas: Yes

t-Plot Report

Micropore Volume: -0.000026 cm³/g
 Micropore Area: *
 External Surface Area: 0.4679 m²/g
 Slope: 0.302471 ± 0.007828 cm³g-nm STP
 Y-Intercept: -0.016685 ± 0.003356 cm³g STP
 Correlation Coefficient: 0.997664
 Surface Area Correction Factor: 1.000
 Density Conversion Factor: 0.0015468
 Total Surface Area (BET): 0.4401 m²/g
 Thickness Range: 0.35000 nm to 0.50000 nm
 Thickness Equation: Harkins and Jura
 $t = [13.99 / (0.034 - \log(P/P_0))] ^{0.5}$

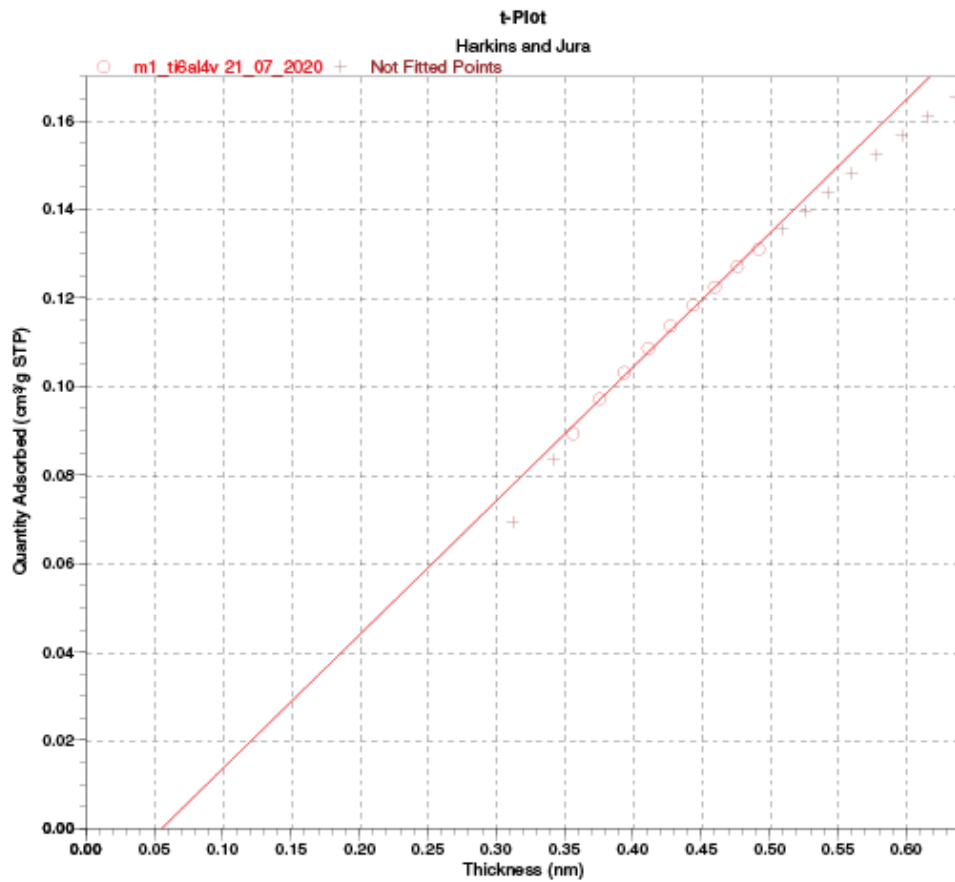
Relative Pressure (P/P ₀)	Statistical Thickness (nm)	Quantity Adsorbed (cm ³ g STP)
0.039658079	0.31216	0.0694
0.068962850	0.34210	0.0834
0.085601419	0.35638	0.0893
0.110621475	0.37589	0.0971
0.135562287	0.39396	0.1032
0.161202412	0.41139	0.1086
0.185750443	0.42762	0.1136
0.211558676	0.44434	0.1184
0.236063373	0.46006	0.1224
0.261841983	0.47658	0.1272
0.288180647	0.49224	0.1310
0.312094025	0.50913	0.1355
0.337279145	0.52581	0.1397
0.362315929	0.54275	0.1438
0.387318258	0.56011	0.1482
0.412648638	0.57823	0.1523
0.437668450	0.59675	0.1566
0.462831454	0.61609	0.1609
0.487944250	0.63621	0.1655

* The micropore area is not reported because either the micropore volume is negative or the calculated external surface area is larger than the total surface area.

Sample: m1_ti6al4v 21_07_2020
 Operator:
 Submitter:
 File: C:\2020\DATA\M1TI64.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31
 Completed: 21/07/2020 22:16:37
 Report Time: 23/07/2020 8:30:54
 Sample Mass: 4.1944 g
 Cold Free Space: 46.6703 cm³
 Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
 Analysis Bath Temp.: 77.414 K
 Thermal Correction: No
 Warm Free Space: 15.8506 cm³ Measured
 Equilibration Interval: 10 s
 Automatic Degas: Yes





ASAP 2020 V3.01 H

Unit 1

Serial #: 769

Page 9

Sample: m1_ti6al4v 21_07_2020
 Operator:
 Submitter:
 File: C:\2020\DATA\M1TI64.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31 Analysis Adsorptive: N2
 Completed: 21/07/2020 22:16:37 Analysis Bath Temp.: 77.414 K
 Report Time: 23/07/2020 8:30:54 Thermal Correction: No
 Sample Mass: 4.1944 g Warm Free Space: 15.8506 cm³ Measured
 Cold Free Space: 46.6703 cm³ Equilibration Interval: 10 s
 Low Pressure Dose: None Automatic Degas: Yes

BJH Adsorption Pore Distribution Report

Fass Correction

Halsey

$$t = 3.54 [-5 / \ln(P/P_0)]^{0.333}$$

Diameter Range: 1.7000 nm to 300.0000 nm

Adsorbate Property Factor: 0.95300 nm

Density Conversion Factor: 0.0015468

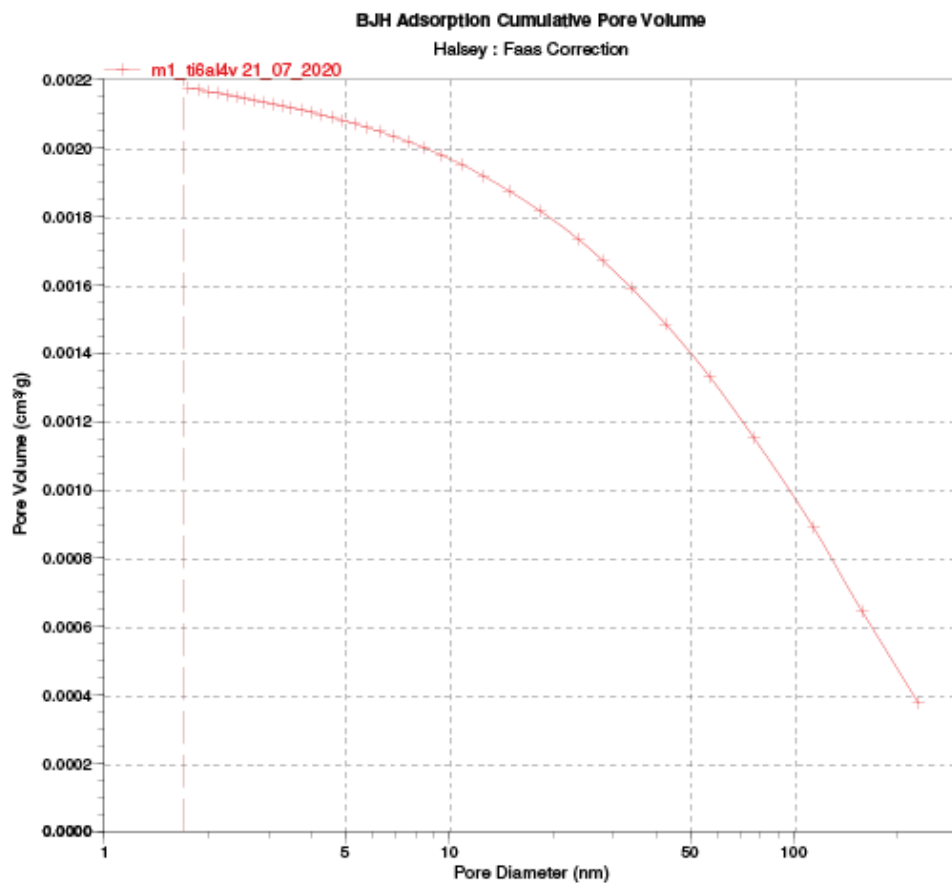
Fraction of Pores Open at Both Ends: 0.00

Pore Diameter Range (nm)	Average Diameter (nm)	Incremental Pore Volume (cm ³ /g)	Cumulative Pore Volume (cm ³ /g)	Incremental Pore Area (m ² /g)	Cumulative Pore Area (m ² /g)
366.5 - 229.4	267.7	0.000377	0.000377	0.006	0.006
229.4 - 157.5	180.4	0.000269	0.000645	0.006	0.012
157.5 - 113.9	128.7	0.000245	0.000890	0.008	0.019
113.9 - 76.5	88.0	0.000263	0.001153	0.012	0.031
76.5 - 57.0	63.9	0.000178	0.001331	0.011	0.042
57.0 - 42.4	47.5	0.000155	0.001486	0.013	0.055
42.4 - 33.7	37.0	0.000105	0.001591	0.011	0.067
33.7 - 27.9	30.2	0.000079	0.001670	0.011	0.077
27.9 - 23.7	25.4	0.000063	0.001733	0.010	0.087
23.7 - 18.3	20.3	0.000083	0.001816	0.016	0.103
18.3 - 14.9	16.3	0.000059	0.001875	0.014	0.118
14.9 - 12.6	13.5	0.000043	0.001918	0.013	0.131
12.6 - 10.8	11.6	0.000034	0.001953	0.012	0.143
10.8 - 9.5	10.1	0.000027	0.001979	0.011	0.153
9.5 - 8.5	8.9	0.000022	0.002002	0.010	0.163
8.5 - 7.6	8.0	0.000018	0.002020	0.009	0.172
7.6 - 6.9	7.2	0.000015	0.002035	0.008	0.181
6.9 - 6.3	6.6	0.000014	0.002049	0.008	0.189
6.3 - 5.8	6.0	0.000012	0.002060	0.008	0.197
5.8 - 5.3	5.5	0.000011	0.002071	0.008	0.205
5.3 - 4.9	5.1	0.000010	0.002081	0.007	0.212
4.9 - 4.6	4.7	0.000009	0.002090	0.008	0.220
4.6 - 4.3	4.4	0.000007	0.002098	0.007	0.227
4.3 - 4.0	4.1	0.000008	0.002105	0.008	0.234
4.0 - 3.7	3.8	0.000006	0.002112	0.007	0.241
3.7 - 3.5	3.6	0.000006	0.002118	0.007	0.248
3.5 - 3.3	3.4	0.000006	0.002124	0.007	0.255
3.3 - 3.1	3.2	0.000005	0.002129	0.006	0.261
3.1 - 2.9	3.0	0.000005	0.002134	0.007	0.268
2.9 - 2.7	2.8	0.000005	0.002139	0.007	0.275
2.7 - 2.6	2.6	0.000006	0.002145	0.009	0.284
2.6 - 2.4	2.5	0.000005	0.002150	0.008	0.292
2.4 - 2.3	2.3	0.000005	0.002155	0.009	0.301
2.3 - 2.1	2.2	0.000006	0.002161	0.011	0.312
2.1 - 2.0	2.1	0.000004	0.002165	0.008	0.320
2.0 - 1.9	1.9	0.000006	0.002172	0.013	0.334
1.9 - 1.8	1.8	0.000005	0.002176	0.010	0.344

Sample: m1_ti6al4v 21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M1TI64.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31
Completed: 21/07/2020 22:16:37
Report Time: 23/07/2020 8:30:54
Sample Mass: 4.1944 g
Cold Free Space: 46.6703 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
Analysis Bath Temp.: 77.414 K
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 15.8506 cm³ Measured
Equilibration Interval: 10 s
Automatic Degas: Yes

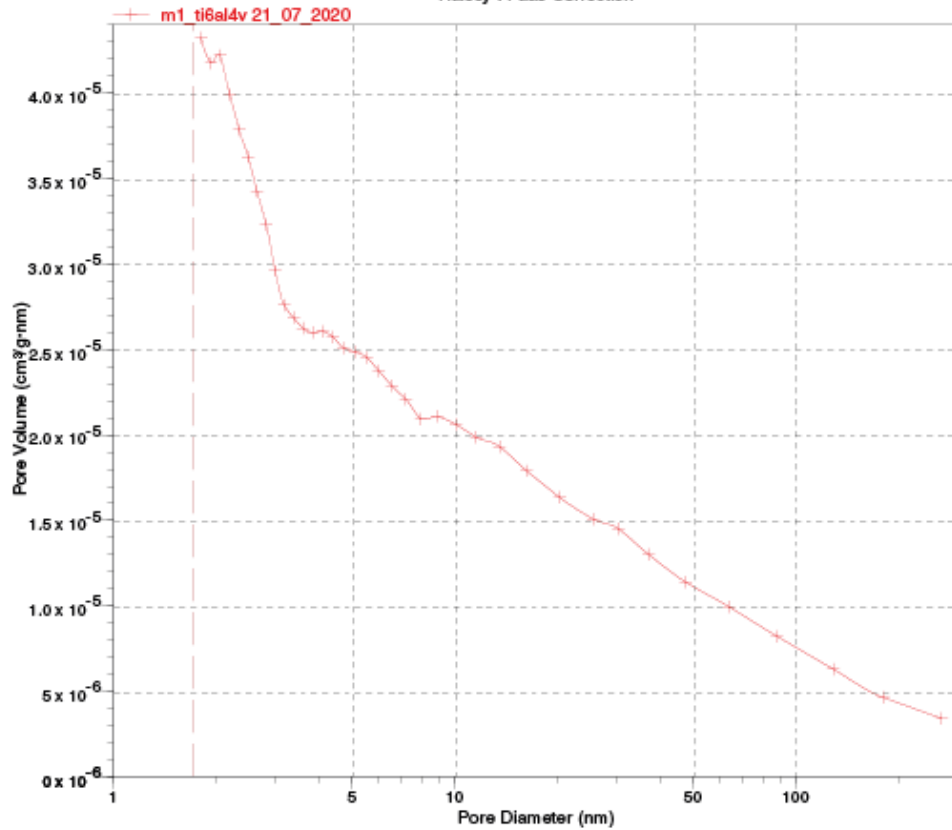


Sample: m1_ti6al4v 21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M1TI64.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31
Completed: 21/07/2020 22:16:37
Report Time: 23/07/2020 8:30:54
Sample Mass: 4.1944 g
Cold Free Space: 46.6703 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N₂
Analysis Bath Temp.: 77.414 K
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 15.8506 cm³ Measured
Equilibration Interval: 10 s
Automatic Degas: Yes

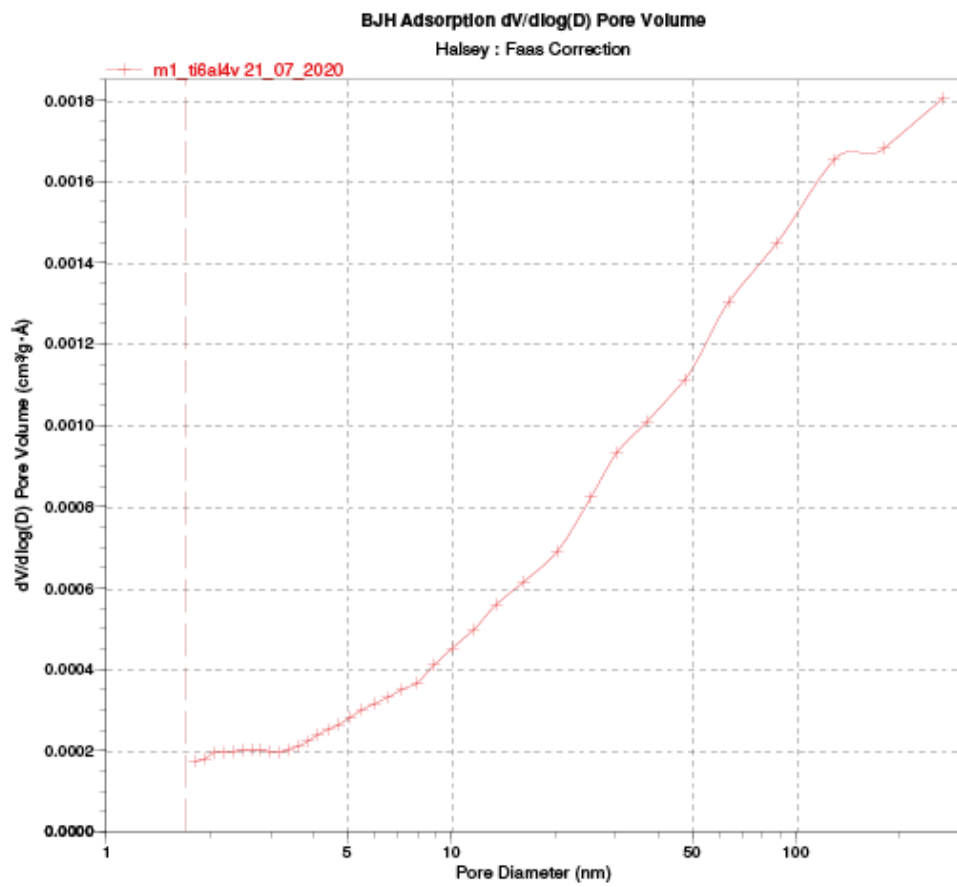
BJH Adsorption dV/dD Pore Volume
Halsey : Faas Correction



Sample: m1_ti6al4v 21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M1TI64.SMP

Started: 21/07/2020 16:38:31
Completed: 21/07/2020 22:16:37
Report Time: 23/07/2020 8:30:54
Sample Mass: 4.1944 g
Cold Free Space: 46.6703 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
Analysis Bath Temp.: 77.414 K
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 15.8506 cm³ Measured
Equilibration Interval: 10 s
Automatic Degas: Yes



Sample: m1_ti_21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33	Analysis Adsorptive: N2
Completed: 22/07/2020 17:54:13	Analysis Bath Temp.: 77.412 K
Report Time: 23/07/2020 8:32:29	Thermal Correction: No
Sample Mass: 3.2421 g	Warm Free Space: 16.3042 cm ³ Measured
Cold Free Space: 48.1245 cm ³	Equilibration Interval: 10 s
Low Pressure Dose: None	Automatic Degas: Yes

Summary Report

Surface Area

Single point surface area at P/Po = 0.211450467: 0.4188 m²/g

BET Surface Area: 0.4305 m²/g

t-Plot Micropore Area: 0.0865 m²/g

t-Plot External Surface Area: 0.3440 m²/g

BJH Adsorption cumulative surface area of pores
between 1.7000 nm and 300.0000 nm diameter: 0.255 m²/g

BJH Desorption cumulative surface area of pores
between 1.7000 nm and 300.0000 nm diameter: 0.3153 m²/g

Pore Volume

t-Plot micropore volume: 0.000035 cm³/g

BJH Adsorption cumulative volume of pores
between 1.7000 nm and 300.0000 nm diameter: 0.001247 cm³/g

BJH Desorption cumulative volume of pores
between 1.7000 nm and 300.0000 nm diameter: 0.001631 cm³/g

Pore Size

BJH Adsorption average pore diameter (4V/A): 19.5616 nm

BJH Desorption average pore diameter (4V/A): 20.6935 nm

Sample: m1_ti_21_07_2020
 Operator:
 Submitter:
 File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33
 Completed: 22/07/2020 17:54:13
 Report Time: 23/07/2020 8:32:29
 Sample Mass: 3.2421 g
 Cold Free Space: 48.1245 cm³
 Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
 Analysis Bath Temp.: 77.412 K
 Thermal Correction: No
 Warm Free Space: 16.3042 cm³ Measured
 Equilibration Interval: 10 s
 Automatic Degas: Yes

Isotherm Tabular Report

Relative Pressure (P/Po)	Absolute Pressure (mmHg)	Quantity Adsorbed (cm ³ /g STP)	Elapsed Time (h:min)	Saturation Pressure (mmHg)
			00:53	766.317688
0.011743362	8.997690	0.0719	01:14	
0.040254836	30.842291	0.0877	01:17	
0.069261900	53.065990	0.0968	01:19	
0.085700200	65.659416	0.1007	01:21	
0.110972797	85.020767	0.1058	01:23	
0.136093443	104.264305	0.1109	01:26	
0.161134828	123.447182	0.1148	01:28	
0.186192650	142.642059	0.1186	01:30	
0.211450467	161.988312	0.1220	01:33	
0.236665721	181.302460	0.1253	01:35	
0.261818789	200.568375	0.1280	01:37	
0.286959684	219.824371	0.1312	01:39	
0.312007769	239.006836	0.1335	01:42	
0.337087918	258.214966	0.1361	01:44	
0.362399236	277.599579	0.1385	01:46	
0.387437150	296.774170	0.1406	01:48	
0.412594603	316.039734	0.1428	01:50	
0.437802820	335.341003	0.1445	01:53	
0.462841853	354.514526	0.1460	01:55	
0.487994932	373.774811	0.1480	01:57	
0.513140180	393.028503	0.1499	01:59	
0.538228628	412.238098	0.1525	02:01	
0.563443281	431.540436	0.1550	02:04	
0.588631293	450.824951	0.1570	02:06	
0.613713412	470.027771	0.1594	02:08	
0.638847269	489.269623	0.1624	02:10	
0.664081241	508.587555	0.1654	02:12	
0.688982898	527.850391	0.1692	02:14	
0.714346104	547.061890	0.1734	02:17	
0.739354898	566.205444	0.1778	02:19	
0.764675139	585.586914	0.1835	02:21	
0.789723578	604.759644	0.1897	02:23	
0.814954116	624.071228	0.1981	02:25	
0.840052103	643.275757	0.2079	02:28	
0.865154467	662.487854	0.2212	02:30	
0.890408332	681.815369	0.2379	02:32	
0.915258611	700.833252	0.2629	02:34	
0.928349159	710.846008	0.2792	02:36	
0.940616765	720.222778	0.3004	02:39	
0.953294335	729.918640	0.3281	02:41	
0.965654394	739.371094	0.3677	02:43	
0.974521754	746.149048	0.4107	02:45	
0.982954450	752.593994	0.4829	02:47	
0.987760014	756.255859	0.5587	02:50	
0.992048895	759.527832	0.6683	02:52	
			02:54	765.603516

Sample: m1_ti_21_07_2020
 Operator:
 Submitter:
 File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33 Analysis Adsorptive: N2
 Completed: 22/07/2020 17:54:13 Analysis Bath Temp.: 77.412 K
 Report Time: 23/07/2020 8:32:29 Thermal Correction: No
 Sample Mass: 3.2421 g Warm Free Space: 16.3042 cm³ Measured
 Cold Free Space: 48.1245 cm³ Equilibration Interval: 10 s
 Low Pressure Dose: None Automatic Degas: Yes

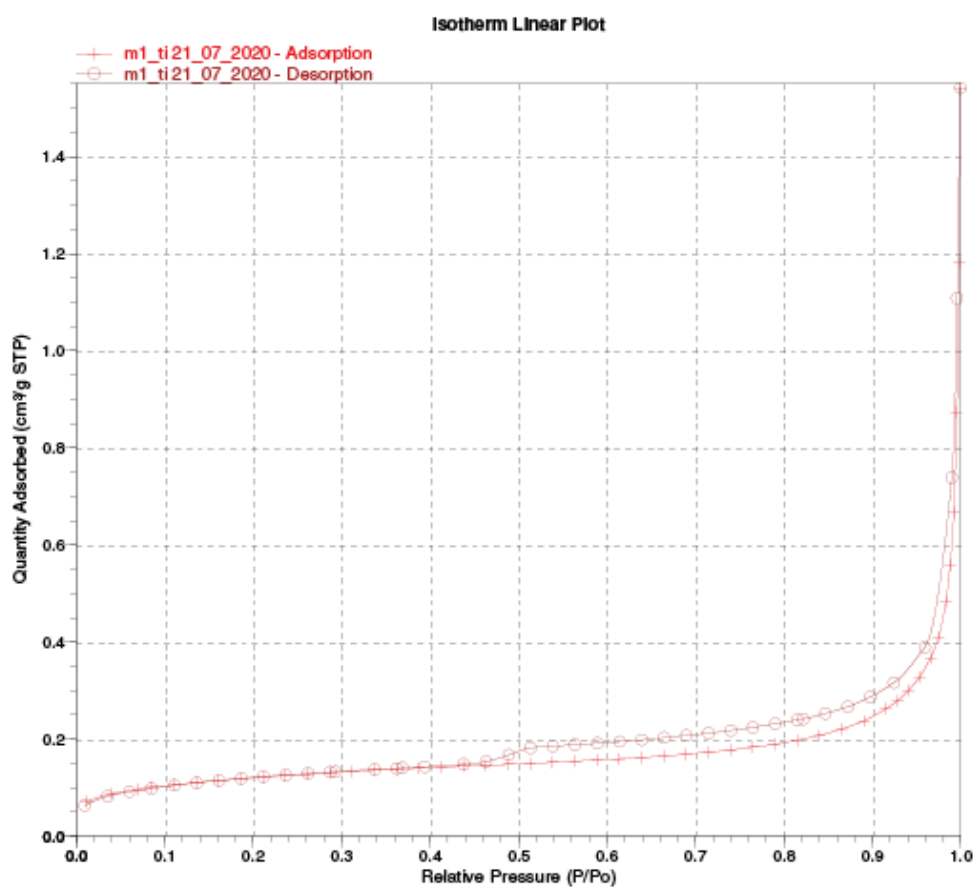
Isotherm Tabular Report

Relative Pressure (P/Po)	Absolute Pressure (mmHg)	Quantity Adsorbed (cm ³ g STP)	Elapsed Time (h:min)	Saturation Pressure (mmHg)
0.995196781	761.773315	0.8732	03:03	
0.998171974	763.977600	1.1819	03:13	
0.999356539	764.764954	1.5413	03:23	
0.995615706	761.842834	1.1085	03:28	
0.989669160	757.245300	0.7393	03:32	
0.959066121	733.795044	0.3891	03:35	
0.924437415	707.267029	0.3168	03:38	
0.897652353	686.752930	0.2870	03:40	
0.872143797	667.216675	0.2670	03:42	
0.846840736	647.828735	0.2531	03:45	
0.821616158	628.512451	0.2419	03:47	
0.815119840	623.523499	0.2397	03:49	
0.790105546	604.360596	0.2318	03:52	
0.764877958	585.045471	0.2244	03:54	
0.739851484	565.885376	0.2180	03:56	
0.714523294	546.487183	0.2125	03:59	
0.689450919	527.294678	0.2079	04:01	
0.664399683	508.119537	0.2032	04:03	
0.639319988	488.923828	0.1987	04:05	
0.614157966	469.859027	0.1949	04:08	
0.589034478	450.432526	0.1916	04:10	
0.563740245	431.076660	0.1889	04:12	
0.538702495	411.918121	0.1856	04:14	
0.513507400	392.834338	0.1824	04:17	
0.488896636	373.804962	0.1675	04:19	
0.463061861	354.040924	0.1537	04:21	
0.437901983	334.788879	0.1482	04:24	
0.393957800	301.182861	0.1434	04:26	
0.368605689	281.792236	0.1409	04:28	
0.362800295	277.345459	0.1399	04:30	
0.337483154	257.979492	0.1378	04:33	
0.293143218	224.078079	0.1329	04:35	
0.287274886	219.585480	0.1322	04:37	
0.262118073	200.346678	0.1294	04:40	
0.237012240	181.151871	0.1260	04:42	
0.211578337	161.707321	0.1229	04:44	
0.186588369	142.601044	0.1192	04:47	
0.161487475	123.413712	0.1150	04:49	
0.136327368	104.182327	0.1104	04:51	
0.111120484	84.916397	0.1052	04:53	
			04:55	764.159241
0.085232630	65.131302	0.0983	04:58	
0.060046243	45.884892	0.0918	05:00	
0.035661869	27.251347	0.0824	05:03	
0.009608545	7.342458	0.0635	05:07	

Sample: m1_ti 21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33
Completed: 22/07/2020 17:54:13
Report Time: 23/07/2020 8:32:29
Sample Mass: 3.2421 g
Cold Free Space: 48.1245 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
Analysis Bath Temp.: 77.412 K
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 16.3042 cm³ Measured
Equilibration Interval: 10 s
Automatic Degas: Yes



Sample: m1_ti_21_07_2020
 Operator:
 Submitter:
 File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33
 Completed: 22/07/2020 17:54:13
 Report Time: 23/07/2020 8:32:29
 Sample Mass: 3.2421 g
 Cold Free Space: 48.1245 cm³
 Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
 Analysis Bath Temp.: 77.412 K
 Thermal Correction: No
 Warm Free Space: 16.3042 cm³ Measured
 Equilibration Interval: 10 s
 Automatic Degas: Yes

BET Surface Area Report

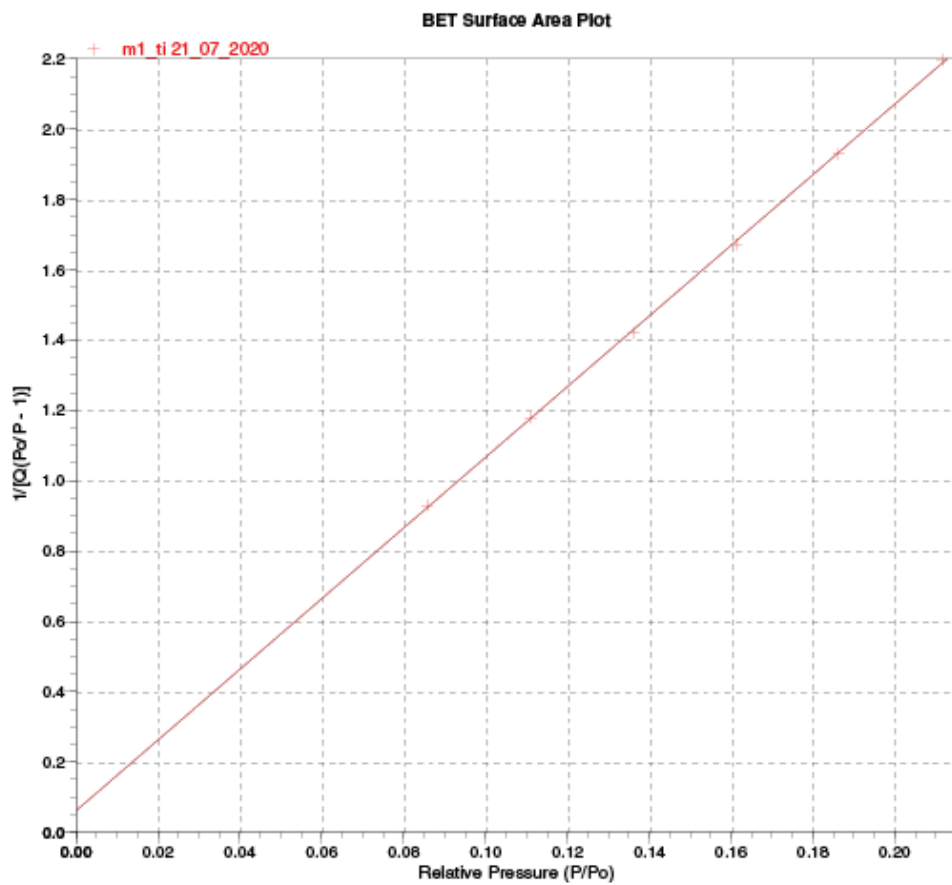
BET Surface Area: 0.4305 ± 0.0037 m²/g
 Slope: 10.051346 ± 0.086496 g/cm³
 STP
 Y-Intercept: 0.061754 ± 0.013378 g/cm³ STP
 C: 163.763384
 Qm: 0.0989 cm³/g STP
 Correlation Coefficient: 0.9998519
 Molecular Cross-Sectional Area: 0.1620 nm²

Relative Pressure (P/Po)	Quantity Adsorbed (cm ³ /g STP)	1/[Q(Po/P - 1)]
0.085700200	0.1007	0.930608
0.110972797	0.1058	1.179508
0.136093443	0.1109	1.420452
0.161134828	0.1148	1.673676
0.186192650	0.1186	1.929751
0.211450467	0.1220	2.197754

Sample: m1_ti 21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33
Completed: 22/07/2020 17:54:13
Report Time: 23/07/2020 8:32:29
Sample Mass: 3.2421 g
Cold Free Space: 48.1245 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
Analysis Bath Temp.: 77.412 K
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 16.3042 cm³ Measured
Equilibration Interval: 10 s
Automatic Degas: Yes



Sample: m1_ti 21_07_2020
 Operator:
 Submitter:
 File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33
 Completed: 22/07/2020 17:54:13
 Report Time: 23/07/2020 8:32:29
 Sample Mass: 3.2421 g
 Cold Free Space: 48.1245 cm³
 Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
 Analysis Bath Temp.: 77.412 K
 Thermal Correction: No
 Warm Free Space: 16.3042 cm³ Measured
 Equilibration Interval: 10 s
 Automatic Degas: Yes

t-Plot Report

Micropore Volume: 0.000035 cm³/g
 Micropore Area: 0.0865 m²/g
 External Surface Area: 0.3440 m²/g
 Slope: 0.222362 ± 0.006348 cm³g-nm STP
 Y-Intercept: 0.022603 ± 0.002723 cm³g STP
 Correlation Coefficient: 0.997160
 Surface Area Correction Factor: 1.000
 Density Conversion Factor: 0.0015468
 Total Surface Area (BET): 0.4305 m²/g
 Thickness Range: 0.35000 nm to 0.50000 nm
 Thickness Equation: Harkins and Jura

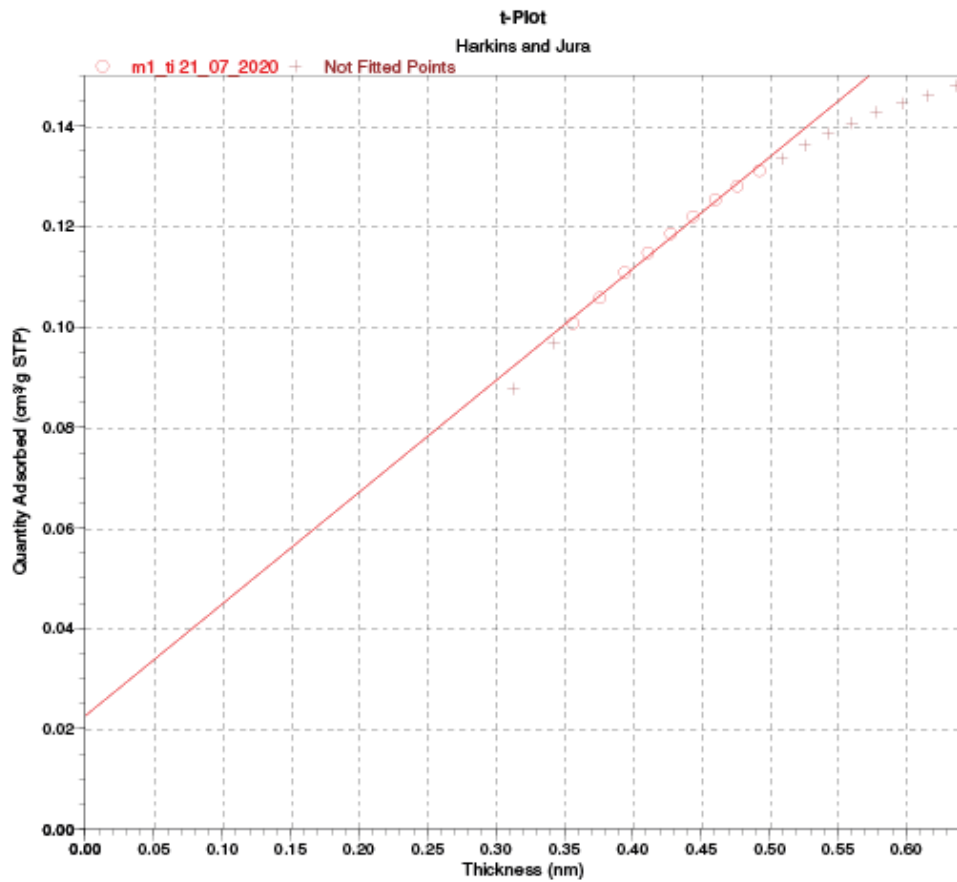
$$t = [13.99 / (0.034 - \log(P/P_0))] ^{0.5}$$

Relative Pressure (P/P ₀)	Statistical Thickness (nm)	Quantity Adsorbed (cm ³ g STP)
0.040254836	0.31287	0.0877
0.069261900	0.34237	0.0968
0.085700200	0.35646	0.1007
0.110972797	0.37615	0.1058
0.136093443	0.39423	0.1109
0.161134828	0.41134	0.1148
0.186192650	0.42791	0.1186
0.211450467	0.44427	0.1220
0.236665721	0.46045	0.1253
0.261818789	0.47656	0.1280
0.286959684	0.49275	0.1312
0.312007769	0.50907	0.1335
0.337087918	0.52568	0.1361
0.362399236	0.54281	0.1385
0.387437150	0.56020	0.1406
0.412594603	0.57819	0.1428
0.437802820	0.59685	0.1445
0.462841853	0.61610	0.1460
0.487994932	0.63626	0.1480

Sample: m1_ti_21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33
Completed: 22/07/2020 17:54:13
Report Time: 23/07/2020 8:32:29
Sample Mass: 3.2421 g
Cold Free Space: 48.1245 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
Analysis Bath Temp.: 77.412 K
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 16.3042 cm³ Measured
Equilibration Interval: 10 s
Automatic Degas: Yes





ASAP 2020 V3.01 H

Unit 1

Serial #: 769

Page 9

Sample: m1_ti_21_07_2020
 Operator:
 Submitter:
 File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33
 Completed: 22/07/2020 17:54:13
 Report Time: 23/07/2020 8:32:29
 Sample Mass: 3.2421 g
 Cold Free Space: 48.1245 cm³
 Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
 Analysis Bath Temp.: 77.412 K
 Thermal Correction: No
 Warm Free Space: 16.3042 cm³ Measured
 Equilibration Interval: 10 s
 Automatic Degas: Yes

BJH Adsorption Pore Distribution Report

Fass Correction

Halsey

$$t = 3.54 [-5 / \ln(P/P_0)]^{0.333}$$

Diameter Range: 1.7000 nm to 300.0000 nm

Adsorbate Property Factor: 0.95300 nm

Density Conversion Factor: 0.0015468

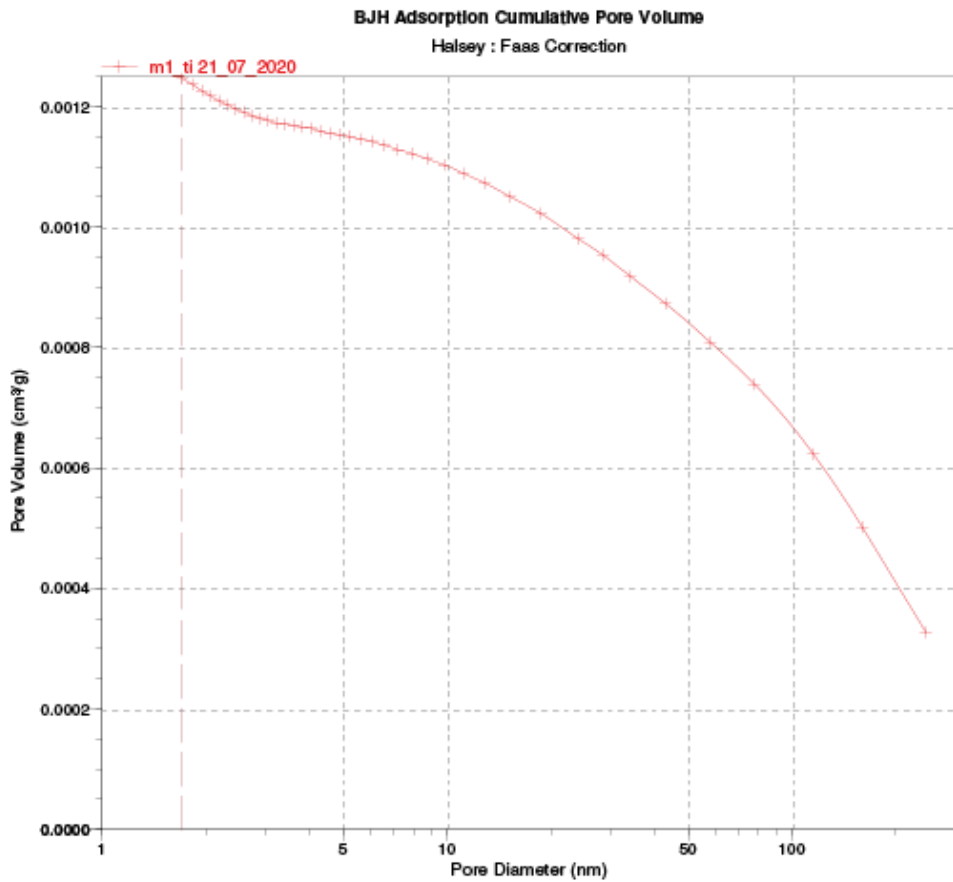
Fraction of Pores Open at Both Ends: 0.00

Pore Diameter Range (nm)	Average Diameter (nm)	Incremental Pore Volume (cm ³ /g)	Cumulative Pore Volume (cm ³ /g)	Incremental Pore Area (m ² /g)	Cumulative Pore Area (m ² /g)
397.9 - 244.6	296.3	0.000327	0.000327	0.005	0.005
244.6 - 159.8	184.9	0.000175	0.000502	0.004	0.008
159.8 - 115.3	130.4	0.000122	0.000623	0.004	0.012
115.3 - 77.7	89.3	0.000116	0.000740	0.005	0.017
77.7 - 58.0	65.0	0.000069	0.000809	0.004	0.022
58.0 - 43.0	48.2	0.000064	0.000873	0.005	0.027
43.0 - 34.0	37.4	0.000045	0.000919	0.005	0.032
34.0 - 28.3	30.6	0.000035	0.000954	0.005	0.036
28.3 - 24.0	25.8	0.000027	0.000981	0.004	0.041
24.0 - 18.7	20.7	0.000042	0.001023	0.008	0.049
18.7 - 15.3	16.6	0.000028	0.001051	0.007	0.055
15.3 - 12.9	13.9	0.000022	0.001073	0.006	0.062
12.9 - 11.2	11.9	0.000016	0.001090	0.005	0.067
11.2 - 9.8	10.4	0.000014	0.001104	0.005	0.073
9.8 - 8.8	9.2	0.000010	0.001114	0.004	0.077
8.8 - 7.9	8.3	0.000009	0.001123	0.004	0.081
7.9 - 7.2	7.5	0.000007	0.001129	0.004	0.085
7.2 - 6.6	6.9	0.000007	0.001136	0.004	0.089
6.6 - 6.1	6.3	0.000006	0.001142	0.004	0.093
6.1 - 5.6	5.8	0.000004	0.001146	0.003	0.096
5.6 - 5.2	5.4	0.000004	0.001151	0.003	0.099
5.2 - 4.9	5.0	0.000003	0.001154	0.002	0.101
4.9 - 4.6	4.7	0.000002	0.001156	0.002	0.103
4.6 - 4.3	4.4	0.000004	0.001160	0.003	0.107
4.3 - 4.0	4.2	0.000004	0.001164	0.004	0.111
4.0 - 3.8	3.9	0.000002	0.001167	0.003	0.113
3.8 - 3.6	3.7	0.000003	0.001170	0.003	0.116
3.6 - 3.4	3.5	0.000001	0.001171	0.002	0.118
3.4 - 3.2	3.3	0.000002	0.001173	0.002	0.121
3.2 - 3.0	3.1	0.000004	0.001177	0.005	0.126
3.0 - 2.9	3.0	0.000003	0.001181	0.005	0.130
2.9 - 2.7	2.8	0.000005	0.001185	0.007	0.137
2.7 - 2.6	2.6	0.000006	0.001191	0.009	0.146
2.6 - 2.4	2.5	0.000005	0.001196	0.007	0.154
2.4 - 2.3	2.4	0.000008	0.001204	0.013	0.167
2.3 - 2.2	2.2	0.000006	0.001210	0.011	0.177
2.2 - 2.1	2.1	0.000008	0.001218	0.016	0.193
2.1 - 1.9	2.0	0.000009	0.001227	0.018	0.211
1.9 - 1.8	1.9	0.000010	0.001237	0.021	0.232
1.8 - 1.7	1.8	0.000010	0.001247	0.023	0.255

Sample: m1_ti 21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33
Completed: 22/07/2020 17:54:13
Report Time: 23/07/2020 8:32:29
Sample Mass: 3.2421 g
Cold Free Space: 48.1245 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
Analysis Bath Temp.: 77.412 K
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 16.3042 cm³ Measured
Equilibration Interval: 10 s
Automatic Degas: Yes



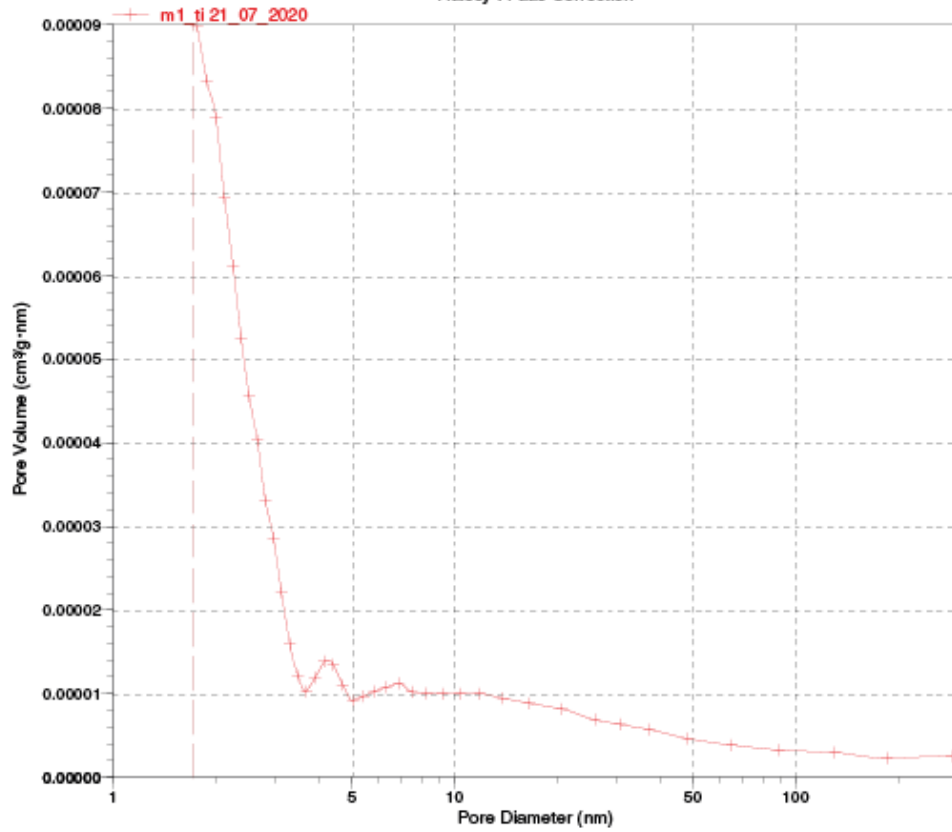
Sample: m1_ti 21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33
Completed: 22/07/2020 17:54:13
Report Time: 23/07/2020 8:32:29
Sample Mass: 3.2421 g
Cold Free Space: 48.1245 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N₂
Analysis Bath Temp.: 77.412 K
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 16.3042 cm³ Measured
Equilibration Interval: 10 s
Automatic Degas: Yes

BJH Adsorption dV/dD Pore Volume

Halsey : Faas Correction



Sample: m1_ti 21_07_2020
Operator:
Submitter:
File: C:\2020\DATA\M2TI.SMP

Started: 22/07/2020 12:33:33
Completed: 22/07/2020 17:54:13
Report Time: 23/07/2020 8:32:29
Sample Mass: 3.2421 g
Cold Free Space: 48.1245 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
Analysis Bath Temp.: 77.412 K
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 16.3042 cm³ Measured
Equilibration Interval: 10 s
Automatic Degas: Yes

