



Los efectos de la superficie SLA+Nano/Fosfato de Calcio en la Osteointegración de un implante dental titanio.

Afiliación de los autores : Kyung-hee Choi ^{1,4†}, Xavier Rocca Mompel ^{2,4†}, Tarek El Diaz Halabi ³, Alberto Coruna ², Soo-hong Kim ^{4,5†}, Jungbo-Huh ⁵

Correspondencia a : Soo-hong Kim Tel: +82 2 3453 5085 Fax: +82 2 3453 5086

¹ El instituto de Ingeniería de Tejidos, ² Departamento de Somatología, Universidad de Barcelona, España, ³ Departamento de Somatología IV, Complutense de Madrid, España, ⁴ Instituto de Investigación y Educación en Implantología, Seúl, Corea del Sur, ⁵ Departamento de Odontología, Facultad de Medicina, Universidad de Busan, Corea del Sur.

(Aceptado : 15 de Enero de 2018)

Objetivo: El Objetivo de este estudio ha sido para evaluar la eficiencia de los tratamientos de superficie que se combinan con la aplicación de voladura y química por la investigación del nivel de Osteointegración usando el estudio de animal.

Materiales y Métodos: Las muestras se dividieron en 3 grupos de acuerdo con el método de tratamiento de superficie. Estos grupos son los grupos de control (Superficie Maquinada), Grupo SLA (Arenado y grabados al ácido) y SLA+Nano/Fosfato de Calcio. Las características de la superficie se observaron con prueba de ángulo de contacto de agua y SEM. En el experimento con animales, todos los premolares inferiores y primeros molares se extrajeron bilateralmente en tres perros beagle. Después de un período de cicatrización de 2 meses, cada lado de la mandíbula recibió cuatro implantes dentales asignados al azar alternando entre la superficie mecanizada y la superficie SLA. Los animales fueron sacrificados después de 8 semanas de período de cicatrización. En ese análisis histométrico, se calculó la relación de contacto hueso-implante (% BIC en inglés) en los hilos. Todos los datos fueron analizados estadísticamente con t-test ($\alpha=0.05$).

Resultados: La Rugosidad superficial del grupo SLA y del grupo SLA+Nano/Fosfato de Calcio mostró la misma rugosidad a bajo del nivel de aumento x100. En el análisis histométrico de la prueba en animales, el valor de contacto hueso-implante del grupo SLA+Nano/Fosfato de Calcio (73.3%) fue más que el grupo de la máquina (54.7%) y el grupo SLA (64.4%) ($P < 0.05$).

Conclusión: En este estudio en vivo, el tratamiento de superficie que se combinan con la voladura, grabado y el recubrimiento de Nano/Fosfato de Calcio (SLA+Nano/Fosfato de Calcio) mejoró el grado de Osteointegración del implante.

Albrektsson et al. (1981) reconocieron temprano con respecto a la superficie del implante, incluida la topografía la química, la carga superficial y la humectabilidad. Es uno de los factores importantes que influyen en la Osteointegración. Se realizó una gran cantidad de investigaciones para examinar superficies de titanio alteradas y se centró en técnicas de superficie sustractiva tales como el chorreado de arena y/o el procedimiento de grabado ácido (Wennberg, A et al. 1996, 1998, Buser et al. 1991, Buser et al. 1998). Demostraron que la nueva superficie de titanio tenía una mejor integración ósea que las superficies de titanio mecanizadas. Se observó un porcentaje de contacto de Hueso-Implante (BIC) adyacente a las superficies del titanio con la rugosidad de micro, en comparación con la superficie de titanio mecanizada (Buser D 2001). Además de la rugosidad de la superficie, la química de la superficie es otro factor importante para la aposición ósea periimplantaria, ya que influye en la carga superficial y la humectabilidad de la superficie. La humectabilidad de la superficie depende en gran medida de la energía de la superficie e influye en el grado de contacto con el entorno fisiológico. El aumento de la humectabilidad mejora la interacción entre la superficie del implante y el entorno biológico (Kilpadi & Limones 1994). El tratamiento de superficie SLA consiste en pulverizar partículas

grandes de grano (250-500 μm) sobre la superficie del implante y filtrar con ácido la superficie del implante de titanio (Buser et al. 2004). El gran chorro de arena es para lograr una macro-rugosidad de 18-23 μm . Numerosos informes han demostrado que tanto la fijación temprana como la estabilidad mecánica a largo plazo se pueden mejorar con esta rugosidad. Además, la superficie del SLA en la que se logró una microrrugosidad de 2-4 μm con grabado ácido ($\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$) mejoró el proceso osteoconductor. Los experimentos mostraron un mayor contacto hueso a implante con las superficies SLA que las superficies TPS y el valor de torsión de extracción mejorado. Buser et al. informaron la tasa de éxito del 99% de su estudio clínico de cinco años sobre la carga de los implantes tratados con superficie SLA durante las 6 semanas.

Se han desarrollado características de superficie que incluyen hidrofiliidad, enlaces químicos y nanoestructuras con la intención de mejorar / acelerar Osteointegración (Wennerberg y Albrektsson 2010). Una superficie hidrofílica de SLA sumergida en NaCl mostró un mayor contacto hueso-implante en comparación con una superficie hidrofóbica de SLA (Buser et al. 2001). Los implantes recubiertos de fosfato de calcio demuestran una mayor resistencia a la rotura y un mayor contacto hueso-implante en comparación con los implantes que no es recubiertos en un modelo de fémur de rata (Mendes et al. 2007). Pocos estudios han investigado la importancia de las nanoestructuras de la superficie de los implantes dentales para la Osteointegración (Meirelles et al. 2008). Se ha demostrado que las nanoestructuras obtenidas a través del recubrimiento de hidroxiapatita (HA) mejoran la formación de hueso (Meirelles et al. 2008). Las superficies de implantes dentales de titanio SLA que recubiertos de HA muestran una adherencia mesenquimatosa de células madre significativamente mejorada, actividad de fosfatasa alcalina incrementada, contenido de oseoalcina y expresión de ARNm de oseoontina en comparación con superficies de control SLA in vitro (Wang et al. 2008).

En este estudio, se compare la eficiencia superficial del tratamiento de superficie combinado con el procedimiento de recubrimiento de granalla abrasiva, ácido y Nano/Fosfato de Calcio con la superficie mecanizada y la superficie de SLA mediante la investigación del nivel de Osteointegración utilizando experimentos con los animales.

Materiales y Métodos

Materiales

Para los experimentos con animales, se usaron los implantes de titanio de grado 4 (Dynamet, Washington, PA, EE. UU.) Con un diámetro de 3,75 mm y una longitud de 7 mm. Las muestras se dividieron en 3 grupos de acuerdo con el tratamiento superficial. Ellos son el control y los grupos SLA-SH. El grupo de control ha mecanizado superficie de titanio y superficie SLA. Para el grupo SLA-SH, las partículas bifásicas de fosfato cálcico con un diámetro de 0,18-0,5 mm se volaron sobre la superficie de titanio maquinada en cuatro direcciones con 0,8 MPa para producir macro rugosidad. En la superficie, se aplicó una mezcla de $\text{HCl}:\text{H}_2\text{PO}_4:\text{H}_2\text{O}$ a 80 ° C durante 1 hora y se recubrió con fosfato de nano-calcio hidrofílico.

Caracterización de la superficie

Utilizando una recubridora por pulverización catódica (SCD 005, BALTEC [Leica Microsystems GmbH], Wetzlar, Alemania), cada muestra de disco se recubrió con platino. Las muestras recubiertas con platino se fotografiaron utilizando un microscopio electrónico de emisión de campo (FE-SEM; Quanta 200, FEI, Hillsboro, OR, EE.UU.) con aumento de x100 y x500 para observar sus microestructuras. Para investigar los componentes químicos de la superficie, se utilizó un espectrómetro de dispersión de energía (Quanta 200, FEI, Hillsboro, OR, EE.UU.).

Medida de Rugosidad

Después de que la muestra de la superficie que disco trataba se cubrió con platino, se tomaron imágenes 3D de la superficie a aumentos de 800 aumentos a 6° usando un microscopio electrónico de barrido estéreo (Zeiss EVO25; Zeiss, Alemania) y el software MeX V5.1 (Alicona, Grambachm, Austria). Usando un filtro gaussiano con una longitud de onda de corte de $k_c=31\mu\text{m}$, el S_a (El promedio de los valores absolutos de la protrusión

superficial en la superficie medida), Sq (La raíz medida de los valores al cuadrado de la superficie sobrealiente de la superficie medida) y Rt (El promedio de la distancia desde la línea de las alturas máximas y mínimas de la superficie sobrealiente) en la superficie de $340 \times 250 \mu m^2$

Ángulo de contacto de agua estático

Un mes después del procedimiento de empaquetado, se analizó el ángulo de contacto de agua estático del método de gota sésil con el analizador de ángulo de contacto Phoenix 150 (SEO Korea) y el software Image XP 5.6.

Preparación de los implantes experimentales

Se prepararon un total de 15 implantes dentales (Longitud : 7mm y Diámetro : 3.75mm, Cowellmedi Co.,Ltd. Busan, Corea del Sur). Todos los implantes eran de tipo de tornillo y estaban hechos de titanio comercialmente puro de grado 4. Los implantes experimentales se dividieron en tres grupos (5 implantes por grupo) como prueba in vivo.

Cirugía Primaria

Se utilizaron tres perros Beagle de 2-3 años, cada uno de los cuales pesaba 15 kg. Cada beagle se crió en una jaula individualmente en la que la temperatura se mantuvo a $20-25^{\circ} C$ y humedad relativa, a 30-50%. Una dieta blanda con agua antes y después de la cirugía.

La comida fue retenida por la noche antes de la cirugía. Los animales se les inyectó sulfato de atropina (0.05mg/kg) y tiletamina / zolazepam (5mg / kg IV). Durante la cirugía. La anestesia se mantuvo usando isoflurano y suministrando oxígeno. Se inyectó solución de ringer lactato (5ml / kg/h). La ampicilina sódica (20mg/kg IV) y el meloxicam (0.2mg / kg IV) fueron inyectados preoperatoriamente. El área quirúrgica se inyectó con lidocaína que contenía epinefrina (1: 100.000) para la anestesia local. Todo el premolar mandibular y el primer molar se extrajeron cuidadosamente para evitar daños en el alveolo de extracción. La región de furcación del primer molar se recortó utilizando una fresa de fisura. Después de verificar que no quedaba raíz dental, se realizó una sutura con seda 4-0. Después de la extracción, se administró Meloxicam (0.1mg/kg PO) a los animales para aliviar el dolor, y se les administró amoxicilina (20mg / kg PO) cada 12 horas durante 6 días.

Cirugía Secundaria

Después de verificar que el hueso alveolar se curó bien después de dos meses de la cirugía primaria, se realizó la colocación del implante. Los procedimientos de anestesia general y local fueron los mismos que los de la cirugía primaria. Se colocaron cuatro implantes a cada lado de la mandíbula. Se realizó una incisión en la mitad de la cresta del hueso alveolar.

Después de disecar el colgajo de grosor completo, el hueso cortical se niveló. Luego, el sitio del implante se preparó usando un taladro de 3.2mm de diámetro como taladro final. Ocho implantes fueron colocados al azar en ambos lados. La distancia entre los implantes se realiza a intervalos regulares de 4mm con una regla.

La penicilina G Procaína y la penicilina G benzatina (1 ml/5kg) se inyectaron por vía intramuscular en los animales de experimentación inmediatamente después de la cirugía y 48 horas después de la cirugía. La cavidad oral del animal se enjuagó dos veces al día con clorhexidina al 2%. Se permitió una dieta blanda.

Sacrificio de los animales experimentales

Los animales de experimentación fueron sacrificados 8 semanas después de la segunda cirugía. Primero se sedaron con zaperona y midazolam (1mg / kg, IM) antes de sacrificarlos por inyección intravenosa de solución de pentobarbital al 20%.

Preparación de la muestra

La muestra que incluía el implante se preparó después del sacrificio de los animales de experimentación. La muestra se fijó durante 2 semanas en una solución de formalina tamponada neutra, y luego se deshidrató por aumentando la concentración de etanol hasta 70100%. La muestra deshidratada se incrustó en una resina Technovit 7200. Se cortó un bloque de la muestra polimerizada en la dirección del eje largo del implante en el centro del implante utilizando un cortador de diamante EXAKT. Se hizo una diapositiva con un espesor final de 30 μm a partir del portaobjetos de 400 μm de espesor utilizando una rectificadora EXAKT. El tejido se tiñó usando tinción con hematoxilina y eosina.

Análisis Histométrico

Un observador que estaba ciego a las condiciones experimentales analizó los hallazgos histológicos. La medición se realizó tres veces para reducir la posibilidad de error. Las imágenes obtenidas de un microscopio óptico se analizaron usando un programa informático de análisis de imágenes. El centro de la muestra que se cortó en la dirección del lado lingual bucal se utilizó para el análisis histológico. Todas las imágenes de los especímenes se tomaron con una ampliación de $\times 2.5$. $\times 40$ imágenes ampliadas se usaron para el análisis histológico y $\times 100$ imágenes ampliadas para una evaluación precisa del BIC. Se analizaron los siguientes factores (Fig. 2).

Análisis Estadístico

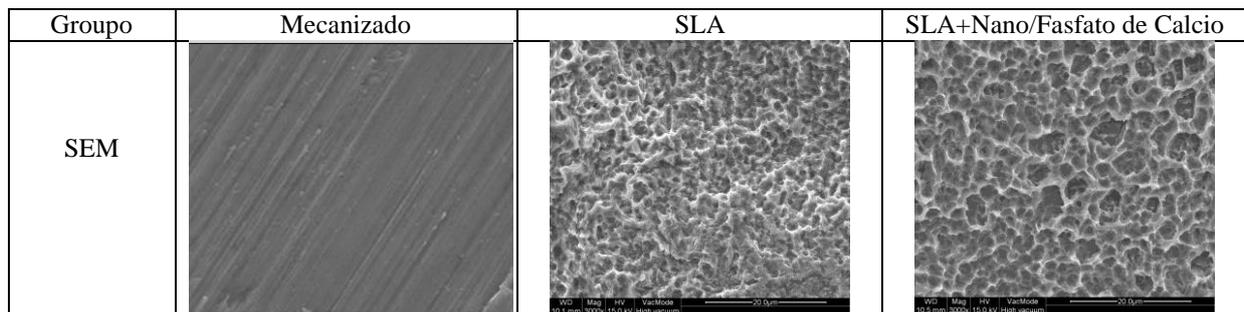
El análisis estadístico se realizó usando SPSS ver. 18.0 (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.). Para analizar las medidas tomadas en animales de prueba individuales, los grupos se compararon utilizando la prueba t de Student. Se tomaron valores de $p < 0,05$ para indicar significación estadística.

RESULTADO

Surface Characterization

A través de SEM, se confirmaron las morfologías superficiales de cada grupo (Fig. 1). El grupo de SLA mostró una marco rugosidad a $\times 3,000$ aumentos. La superficie rugosa tenía picos agudos con alturas irregulares.

Figura 1. Morfología de superficie SEM de cada grupo



Medición de la rugosidad superficial

Utilizando un microscopio electrónico de barrido estéreo (Zeiss EVO25; Zeiss, Alemania), se obtuvo una imagen de superficie 3D de cada muestra, y se calcularon sus S_a , S_q y R_t . El grupo SLA y el grupo SLA + Nano / Fasfato de Calcio mostraron el mayor grado de rugosidad, que fue 20 veces mayor que el grupo de control..

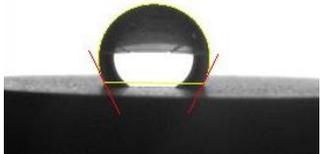
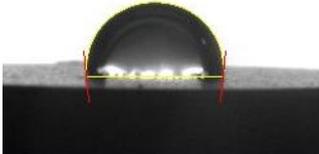
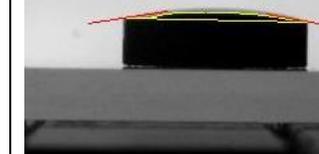
Tabla 1. La rugosidad superficial por el microscopio electrónico de barrido estéreo.

Tratamiento superficial	Sa(μm) \pm SD	Sq(μm) \pm SD	Rt(μm) \pm SD
Mecanizado	0.08 \pm 0.04	0.09 \pm 0.02	1.95 \pm 0.11
SLA	1.68 \pm 0.22	2.15 \pm 0.29	16.99 \pm 3.09
SLA+Nano/Fasfato de Calcio	1.71 \pm 0.24	2.20 \pm 0.231	18.72 \pm 3.21

Ángulo contactado del agua estático.

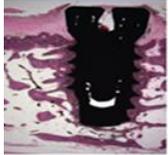
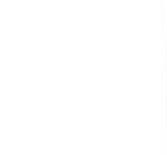
El ángulo contactado del agua estático fue analizado como el grado 10.5 en el grupo de SLA+Nano/Fasfato de Calcio, el grado 54.3 fue calculado en el grupo de SLA y el grado 133.0 es de grupo mecanizado.

El grupo SLA+Nano/Fasfato de Calcio era Súper-hidrofílico.

Grupo	Mecanizado	SLA	SLA+Nano/Fasfato de Calcio
Ángulo contactado del agua			

Análisis Histológico

La observación de la muestra de tejido tratada con H e E (Hematoxilina y eosina) mostró que la Osteointegración fue exitosa con el sacrificio de las 8 semanas. La figura 2 muestra el alcance de la evaluación de cada muestra a 12.5 aumentos. El grupo SLA+Nano/Fasfato de Calcio mostró una formación ósea más madura en la superficie del implante que el grupo mecanizado y el grupo SLA. No se observaron hallazgos inflamatorios significativos en todos los grupos.

Grupo	Mecanizado	SLA	SLA+Nano/Fasfato de Calcio	
Los Hallazgos Histologicos				
				
				

Análisis Histométrico

El grupo mecanizado mostró el valor BIC (%) (media \pm DE) de 54.7 \pm 8.6, el grupo SLA, 64.4 \pm 12.9 y el grupo SLA + Nano / Fasfato de Calcio, 73.3 \pm 15.2.

DISCUSIÓN

Se han realizado muchos estudios en animales para examinar los efectos de la superficie del implante sobre la curación ósea y la aposición ósea.

La superficie de Titanio de Micro-rugosidad tiene regularmente un porcentaje significativamente mayor de BIC en comparación con la superficie mecanizada. La superficie tratada con SLA + Nano / Fوسفato de Calcio se logró mediante voladura usando fosfato de calcio bifásico y grabado con ácido y revestimiento de fosfato de nanocalcio. En este estudio, el fosfato de calcio es un material de explosión biocompatible y reabsorbible. Durante la Osteointegración, la superficie rugosa del implante de titanio proporciona un buen lugar adherente para los osteoblastos y la iniciación de la formación de hueso nuevo comienza desde la superficie de titanio que no sea el hueso alveolar adyacente.

En esta situación, se puede anticipar la oseogénesis de contacto en lugar de la oseogénesis distante. El fosfato de calcio y la macrorugosidad del grupo SLA + Nano / Fوسفato de Calcio pueden contribuir a la adhesión temprana de los osteoblastos. La macrorrueda es importante para que un implante permita la migración de los tejidos capilares y los osteoblastos a los espacios. La rugosidad intenta imitar la función de la matriz extracelular natural. Los principales roles de la macroestructura son: (1) Para servir como un sustrato de adhesión para la célula; (2) Para proporcionar soporte mecánico temporal al tejido recién desarrollado; (3) Para guiar el desarrollo de nuevos tejidos.

En las primeras 1-2 semanas de curación, hubo una capa ósea marcada de las superficies SLA + Nano / Fوسفato de Calcio con la porción central de la cámara experimental del dispositivo de implante menos mineralizada que el área adyacente al implante mecanizado. A partir de las dos semanas, los porcentajes de BIC mostraron un área de contacto significativamente mayor entre el hueso recién formado y el titanio para los implantes con la superficie SLA.

Después de las 6 semanas de curación ósea, las diferencias en el patrón de aposición ósea y en los componentes del tejido habían desaparecido, pero el BIC seguía siendo mayor para la superficie SLA + Nano / Fوسفato de Calcio. En este estudio, tres grupos fueron similares en el patrón de aposición ósea y el componente tisular a las 8 semanas, pero BIC representó mayor para el grupo SLA + Nano / Fوسفato de Calcio. En este estudio, los grupos SLA + Nano / Fوسفato de Calcio mostraron BIC mucho más altos que el grupo mecanizado y SLA. Estas observaciones son consistentes con los informes anteriores con respecto al BIC de tratamiento de la superficie. A partir de esta observación, el tratamiento SLA + Nano / Fوسفato de Calcio será eficaz en la mejora de la Osteointegración de un implante dental.

REFERENCIA

Abrahamsson, I., Berglundh, T., Linder, E., Lang, N. P. & Lindhe, J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces: an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 2004; 15: 381-392

Albrektsson, T., Branemark, P.I., Hansson, H.A. & Lindström, J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long – lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1981; 52:155-170.

Bornstein M. M., Valderrama P., Jones A., Wilson T. G., Seibl R., Cochran D. I., Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant surface: a histomorphometric study in canine mandibles. *Clin. Oral . Impl. Res.* 2008; 19: 233-241

Bornstein MM, Schmid B, Belser UC, Lussi A, Buser D. Early loading of non-submerged titanium implants with a sandblasted and acidetched surface: 5-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16: 631-638.

Buser D, Brogini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res.* 2004; 83: 529–533.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1991; 25: 889-902.

Buser, D.(2001), Titanium for dental application (II): implants with roughened surfaces. In: Brunette, D.M. Tengvall, P., Textor, M., & Thomson, P., eds. *Titanium in Medicine*, 876888.

Berlin: Springer-Verlag. Buser, D., Nydegger, T., Hirt, H. P. Cochran, D. L & Nolte, L. P. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1998;13:611-619.

Kilpadi, D.V. & Lemons, J. E. , Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research* 1994; 28: 1419-1425.

Kim BH, Kim YK, Ok JH. Development of liquid chromatographic method for the analysis of kanamycin residues in varicella vaccine using phenylisocyanate as a derivatization reagent. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; 752: 173–177

Yeong WY, Chua CK, Leong KF, Chandrasekaran M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends Biotechnol.* 2004; 22: 643–652.