

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Programa de doctorado en Ciencias de la Salud



Universidad de Oviedo

TESIS DOCTORAL

Influencia del estímulo biomecánico en la
distribución de las trabéculas óseas alrededor de los
implantes dentales

David Chávarri Prado

Oviedo, 2022

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Programa de doctorado en Ciencias de la Salud



Universidad de Oviedo

TESIS DOCTORAL

Influencia del estímulo biomecánico en la
distribución de las trabéculas óseas alrededor de los
implantes dentales

David Chávarri Prado

Directores:

Ángel Álvarez Arenal

Aritza Brizuela Velasco

Oviedo, 2022

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Influencia del estímulo biomecánico en la disposición de las trabéculas óseas alrededor de implantes dentales durante la osteointegración.	Inglés: Influence of the biomechanical stimulus in the disposition of the bony trabeculae around dental implants during osseointegration.
2.- Autor	
Nombre: David Chávarri Prado	
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

<p>Objetivos: determinar la influencia de la aplicación de carga funcional sobre la osteointegración de implantes dentales, en relación con variables de estabilidad e histomorfométricas, mediante un ensayo experimental en modelo animal.</p> <p>Material and Métodos: Se colocaron 4 implantes de uso humano repartidos en ambas tibias de 10 conejos New Zealand (n=40). Se contempló un periodo de osteointegración de 6 semanas, generando dos grupos mediante asignación aleatorizada: Grupo A Test 5 conejos que corrieron en una cinta de correr 20 minutos diarios durante el periodo de osteointegración y Group B control con los 5 restantes que estuvieron estabulados de manera convencional. Se controlaron variables en relación con la estabilidad primaria y secundaria de los implantes dentales (implant stability quotient), crecimiento óseo vertical, contacto hueso-implante (BIC), área de hueso regenerado y porcentaje de matriz inmadura.</p> <p>Resultados: Los resultados del estudio muestran un mayor crecimiento óseo vertical (Grupo A 1,26±0,48mm, Grupo B 0,32mm±0,47mm), superior incremento en los valores ISQ (Grupo A 11,25 ISQ±6,10, 15,73%; Grupo B 5,80±5,97 ISQ, 7,99%, p=0,006) y mayor porcentaje de contacto hueso implante (Grupo A 19,37%, Grupo B 23,60%, p=) para los implantes del grupo test, con diferencias estadísticamente significativas. También se observa un porcentaje de matriz ósea inmadura superior para los implantes del grupo control (20,68±9,53), comparado con los test (15,38%±8,84) (p = 0,108) y una mayor área de hueso regenerado de los implantes test (Grupo A 280,50 mm²±125,40, Grupo B 228,00 mm²±141,40), pero sin diferencias estadísticamente significativas (p=0,121).</p>

Conclusiones: La aplicación de carga funcional favorece los resultados del proceso de oseointegración de los implantes dentales, en relación con variables de estabilidad e histomorfométricas.

RESUMEN (en Inglés)

Objectives: to determine the influence of the application of functional load on the osseointegration of dental implants, in relation to stability and histomorphometric variables, by means of an experimental test in an animal model.

Material and methods: 4 implants for human use were placed in both tibiae of 10 New Zealand rabbits (n = 40). A 6-week osseointegration period was contemplated, generating two groups by randomized assignment: Group A Test 5 rabbits that ran on a treadmill for 20 minutes during the osseointegration period and Group B control with the remaining 5 that were housed in a conventional manner. Variables related to primary and secondary stability of dental implants, vertical bone growth, bone-implant contact (BIC), regenerated bone area and percentage of immature matrix were controlled.

Results: The results of the study showed greater vertical bone growth (Group A 1.26 ± 0.48 mm, Group B 0.32 ± 0.47 mm), a higher increase in ISQ values (Group A 11.25 ± 6.10 , 15.73%; Group B 5.80 ± 5.97 SSI, 7.99%, $p = 0.006$) and higher percentage of implant bone contact (Group A 19.37%, Group B 23.60%, $p =$) for the implants in the test group, with statistically significant differences. A higher percentage of immature bone matrix is also observed for the implants of the control group (20.68 ± 9.53), compared to the tests (15.38 ± 8.84) ($p = 0.108$) and a greater area of Regenerated bone test of the implants (Group A $280.50 \text{ mm}^2 \pm 125.40$, Group B $228.00 \text{ mm}^2 \pm 141.40$), but without statistically significant differences ($p = 0.121$).

Conclusions: The application of functional load improves the results of the osseointegration process of dental implants, in relation to stability and histomorphometric variables.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN
ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
SALUD

Agradecimientos

Al Dr. Aritza Brizuela Velasco, mi mentor y padre científico, por despertarme y transmitirme su pasión por la ciencia y la investigación, y por empujarme a la realización de esta tesis doctoral.

Al Prof. Dr. Ángel Álvarez Arenal, por concederme el honor de dirigir mi tesis doctoral. Por su paciencia. Por sus enseñanzas de incalculable valor, transmitidas desde su enorme experiencia y conocimiento. Por querer formar parte de este proyecto.

A mis compañeros de la Fundación Osteosite, por compartir conmigo el amor por la investigación y estar ahí cuando se les ha necesitado. En especial, a los compañeros que han participado en este proyecto, sacrificando su tiempo y esfuerzo, poniendo su granito de arena para que mi sueño se haya podido hacer realidad.

A la empresa Klockner S.A., en especial a los señores Alejandro Padrós y Jordi Martínez, por creer en mí y ayudar a que este proyecto saliera adelante, tanto con la cesión de material para el estudio como con su implicación y ayuda técnica.

A mi familia, en especial a mi madre Magdalena Prado, y a mi padre Javier Chávarri. Gracias por habérmelo dado todo. Por haberme hecho ser quién soy, transmitiéndome valores imprescindibles para llegar hasta aquí, como son la cultura del esfuerzo y el afán de superación personal.

A mi esposa, Laida Muro. Por apoyarme en todo momento, por comprender la importancia que este proyecto tenía para mí, por estar a mi lado en las buenas y en las no tan buenas, por ser como es.

A mi hijo Lucas. Porque sin saberlo, ha sido el último empujón necesario para terminar este proyecto, llenándome con su llegada de nuevas fuerzas y motivaciones.

ÍNDICE

PÁGINA

Abreviaturas.....	19
1. Introducción y motivación	23
2. Antecedentes y estado actual del tema	
- El tejido óseo	31
- Propiedades y problemas mecánicos del hueso	42
- Modelado y remodelado óseo.....	45
- Osteointegración	51
- Estabilidad implantaria.....	56
- Disposición de las trabéculas alrededor de los implantes.....	65
3. Hipótesis y objetivos.....	73
4. Material y metodología.....	79
5. Resultados.....	97
6. Discusión de los resultados	111
- Relevancia clínica y aplicabilidad de los resultados.....	149
- Limitaciones del estudio.....	149
- Futuras líneas de investigación.....	151
7. Conclusiones	153
8. Bibliografía.....	157
Anexos	179

ABREVIATURAS

AFR: Análisis de Frecuencia de Resonancia
NASA: National Aeronautics and Space Administration
µm: Micrómetro
Ca: Calcio
P: Fósforo
H: Hidrógeno
O: Oxígeno
ATP: Adenosín Trifosfato
OCN: Osteocalcina
RGD:
SIBLINGS: Small Integrin Binding Ligand, N-Linked Glycoprotein
ALP: Fosfatasa Alcalina
PTH: Parathormona
TRAP: Fosfatasa Ácido Tartrato Resistente
CFU-GM: Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
M-CSF: Factor Estimulante de las Colonias de Macrófagos
OPG: Osteoprotegerina
RANKL: Receptor Activator of NFκb ligand
ODF: Osteoclast Differentiation Factor
TNF: Factor de Necrosis Tumoral
BMU: Unidad Básica Multicelular
MES: Minimum effective strain
ROE: Remodelación Ósea Externa
ROI: Remodelación Ósea Interna
C: Carbono
°C: Grado centígrado
ISQ: Cociente de Estabilidad Implantaria
SLA: Sandblasted, Large-grit, Acid-etched
BIC: Contacto Hueso-Implante
N: Newton
Cm: Centímetro
VPT: Valor Periotest
m: metro
s: segundo
mg: miligramo
mm: milímetro
ml: mililitro
Ti: Titanio
Al: Aluminio
V: Vanadio

1. INTRODUCCIÓN Y MOTIVACIÓN

Desde que en la década de los sesenta el profesor Per-Ingvar Branemark descubriera de forma casual el fenómeno de la osteointegración, la implantología oral ha experimentado una extraordinaria evolución.¹ Nuevas técnicas, nuevos materiales, y nuevos protocolos se han desarrollado con el objetivo de poder ofrecer a los pacientes el tratamiento más seguro, eficaz y predecible. En ese proceso de desarrollo, uno de los elementos que más ha cambiado han sido los protocolos de carga. Mientras que los protocolos clásicos de Branemark sugerían de forma precavida realizar siempre las cirugías de implantes en dos fases, y esperar largos períodos de tiempo de cicatrización (3-6 meses) para la carga funcional, en los últimos años esos tiempos de espera se han ido reduciendo considerablemente, hasta el punto de que hoy en día, los protocolos de carga inmediata están muy extendidos en la práctica odontológica, así como avalados por abundante evidencia científica que los respaldan. El objetivo principal que persigue esta reducción de los tiempos de carga no es otro que el de conseguir una mayor satisfacción por parte del paciente, ya que la reducción de los tiempos de tratamiento, y la posibilidad de llevar dientes provisionales fijos desde el primer momento, son aspectos que se valoran de forma muy positiva por los pacientes en general. Sin embargo, es posible que la satisfacción del paciente por la rapidez y la inmediatez no sean las únicas ventajas de la carga inmediata.

En el año 2015 la N.A.S.A realizó un experimento de gran repercusión científica con los hermanos Kelly como protagonistas, dos astronautas que contaban con una peculiaridad; eran gemelos. Mientras que uno de los hermanos fue enviado a la Estación Espacial Internacional durante un año entero, el otro hermano permaneció en la Tierra ese mismo período. El experimento trataba de analizar los cambios que se producían en el organismo al permanecer durante tanto tiempo en el espacio exterior, utilizando a uno de los gemelos como control. Los hallazgos del estudio fueron sorprendentes a la vez que muy concluyentes, ya que, entre otras muchas cosas, se observó que el hermano que había estado en el espacio había perdido un 20% de su masa ósea en el transcurso de un año, mientras que el hermano que había permanecido en Tierra no había experimentado ninguna variación en este parámetro. Esta pérdida de masa ósea se debe a la ya conocida atrofia ósea por

desuso, explicada de manera sencilla pero brillante por el traumatólogo americano Harold Frost, quien en el año 1987 publicó la teoría del conocido “Mecanostato de Frost”.² Esta teoría planteaba que el hueso no es un tejido invariable, si no que se encuentra en continuo proceso de cambio, gracias a los mecanismos de aposición-resorción y modelado-remodelado, que responden de forma eficaz a los estímulos que el hueso recibe, adaptándose así, en forma y tamaño, a las exigencias biomecánicas a las que está sometido. Casi 100 años antes, a finales del siglo XIX, el traumatólogo alemán Julius Wolff ya había acuñado la célebre frase que decía que la forma y la estructura de los huesos dependen de la tensión y el estrés al que están sometidos, por lo que, modificando las líneas de tensión, la forma de los huesos puede ser alterada. El experimento de los gemelos de la NASA no hace si no demostrar parte de la teoría de Frost, ya que se observó que los huesos del hermano que se encontraba en el espacio habían perdido mucha densidad, como resultado de no estar sometidos a la fuerza de la gravedad, y de recibir, por tanto, un estímulo biomecánico prácticamente nulo.

Si aplicáramos este descubrimiento, y la teoría del mecanostato de Frost a las rehabilitaciones orales implantosoportadas, esto podría significar un cambio de paradigma en los protocolos de carga tal y como los conocemos en la actualidad. Si la evidencia científica nos ha demostrado que la ausencia de carga o tensión, provoca atrofia y pérdida de masa en el tejido óseo ¿qué nos hace pensar a los dentistas que la mejor manera de rehabilitar los implantes dentales es esperar 3 meses antes de someterlos a función? ¿no es acaso un protocolo contraproducente desde el punto de vista de la biomecánica y la fisiología ósea? Sin ir más lejos, en otras disciplinas médicas como la traumatología, hace tiempo que se viendo un cambio de tendencia en los protocolos de funcionalización. Mientras que hace unos años, a los pacientes operados de cadera para la colocación de una prótesis, se les recomendaba reposo absoluto en cama durante una temporada para que la prótesis “soldara” bien, en la actualidad cada vez son más los facultativos que prescriben a sus pacientes comenzar a andar desde el primer día tras la intervención, con el claro propósito de someter a función la cadera intervenida, y que el tejido óseo que circunda la prótesis reciba tensión en todo momento. Este cambio de tendencia no se debe a una moda entre los traumatólogos, si no que responde a una fuerte evidencia científica que

aconseja esta forma de proceder, ya que son muchos los artículos científicos que demuestran los beneficios para su recuperación de someter a carga los huesos intervenidos quirúrgicamente.

Aplicando esta forma de proceder al pequeño campo de la implantología oral, la lógica nos empujaría a pensar que los protocolos de carga inmediata no sólo podrían ser interesantes desde el punto de vista de la estética y de la satisfacción del paciente, si no que desde un punto de vista biomecánico y fisiológico, podrían ser positivos para lograr una mejor osteointegración y una distribución favorable de la estructura ósea periimplantaria.

Indudablemente, la carga inmediata es un protocolo de rehabilitación que no puede realizarse en todos los casos, ya que se deben cumplir una serie de requisitos que nos permitan llevarla a cabo de forma segura y predecible, siendo la estabilidad primaria uno de los más relevantes. Por otro lado, es un protocolo que debe llevarse a cabo con sumo cuidado y precaución, y de la misma manera que un paciente recién operado de cadera no puede ponerse a correr maratones, un paciente rehabilitado con implantes y carga inmediata, no debería comer bocadillos de jamón el primer día.

Por otro lado, en la literatura científica actual no está suficientemente descrito el efecto que produce la carga inmediata en la disposición y estructuración del hueso alrededor de los implantes dentales, de la misma manera que no hay evidencia suficiente sobre si la carga inmediata beneficia o perjudica el proceso de osteointegración de los mismos. Por este motivo, la justificación de este proyecto de tesis doctoral es clarificar esta cuestión, mediante un estudio histológico e histomorfométrico realizado sobre un modelo de experimentación animal in vivo.

2. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

EL TEJIDO ÓSEO

El hueso es un tejido conectivo especializado caracterizado principalmente por su matriz orgánica mineralizada. Dentro de esta matriz se depositan iones de calcio y de fosfato en la forma definitiva de hidroxapatita. Esta composición le permite al hueso ejercer sus tres funciones principales:

- Función mecánica, donde se constituye como soporte para soportar cargas y lugar de inserción de los músculos.
- Función protectora, siendo el tejido de protección para los órganos vitales y la médula ósea.
- Función metabólica, participando en la homeostasis y ejerciendo de reservorio de iones importantes en la misma, como los mencionados calcio y fósforo.³

La forma de los huesos sigue unos estereotipos bastante definidos. Así, independientemente del animal al que pertenezca, se puede distinguir fácilmente una tibia de un fémur, por ejemplo. También resulta inmediato diferenciar el fémur de un humano del de cualquier otro primate. Todo esto parece indicar que los huesos son estructuras bastante estáticas y definidas. Nada más lejos de la realidad. Si se pasa a una escala microscópica, se podrá comprobar que los huesos son estructuras muy dinámicas, en continua evolución, que se adaptan a los cambios fisiológicos y funcionales a los que se les somete. Este proceso de adaptación, conocido como remodelación ósea, hace que, dentro de unos márgenes, la forma y propiedades mecánicas de los huesos sea muy variable de un individuo a otro y altamente dependiente del tipo de actividad que el individuo desarrolla.

TIPOS DE HUESO

Clasificación según su estructura en Cortical y trabecular

Esta es sin duda la forma más común de distinguir a los tejidos óseos y atiende a la diferente porosidad de uno y otro tipo, por lo que también se suelen denominar esponjoso y compacto respectivamente.⁴ El hueso cortical o compacto es el hueso de baja porosidad y el hueso trabecular o esponjoso es el de porosidad alta, y aunque en principio, la porosidad puede variar entre 0 y 1, es difícil encontrar un tejido con porosidad intermedia.

El hueso cortical o compacto tiene una porosidad entre 0.05 y 0.1 y constituye el 80% del esqueleto humano. Se encuentra en la parte central de los huesos largos y envolviendo el hueso trabecular en huesos largos, cortos y planos, a modo de corteza; de ahí su nombre. Una observación más detallada del hueso cortical muestra que este tejido es realmente poroso, por lo que la diferencia entre hueso cortical y hueso trabecular depende solamente de la cantidad de materia sólida, y del tamaño y número de espacios en cada uno. Las cavidades o huecos son pequeñas en el hueso cortical y la cantidad de materia abundante, mientras que en el hueso esponjoso los espacios son grandes y la materia sólida está presente en menor proporción.

Las principales funciones del hueso cortical son mecánicas y de protección. Está calcificado en un 80-90% de su volumen y representa el 75% de la masa esquelética total.⁵ La sustancia mineralizada se deposita en forma de capas o laminillas. Las fibras de colágeno están muy ordenadas de forma que en cada laminilla todas las fibras de colágeno son paralelas, pero su orientación cambia de una laminilla a la siguiente. Las cavidades lenticulares, llamadas lagunas óseas, están repartidas de forma más o menos regular y albergan cada una un osteocito. De cada laguna surgen canalículos en todas direcciones atravesando las laminillas llegándose a unir con los canalículos de las lagunas vecinas. Estos canalículos permiten la difusión y el intercambio de metabolitos.

Las laminillas se disponen de tres formas distintas. La gran mayoría están dispuestas concéntricamente alrededor de un canal vascular del interior del hueso, formando unidades estructurales cilíndricas llamadas sistemas haversianos u osteonas. Entre estos sistemas haversianos, hay fragmentos de hueso laminar de forma y tamaño irregular, que son sistemas intersticiales correspondientes a restos de antiguas osteonas. Como consecuencia de la continua reabsorción y deposición de hueso, las osteonas más jóvenes que están en crecimiento fagocitan a las más viejas adyacentes, menos activas. Algunos sistemas de Havers pueden llegar a perder su estructura y aparecen laminillas que no rodean a un canal central. Ambos sistemas están separados por unas líneas nítidamente marcadas, llamadas líneas de cemento, compuestas principalmente por sustancia blanca calcificada y una escasa cantidad de fibras de colágeno. En la superficie externa del hueso cortical, inmediatamente por debajo del periostio y sobre su superficie interna, por debajo del endostio, se encuentran las laminillas circunferenciales internas y externas. Son similares a

los sistemas intersticiales, pero ocupan zonas limitantes del hueso. Su origen se debe a la actividad osteogénica del periostio y endostio.

Asimismo, la porosidad en el hueso cortical consiste en huecos de tres tipos:

a) Canales de Havers, longitudinales al eje del hueso, de unos 20-40 μm de diámetro. Contienen uno o dos vasos sanguíneos y pasan por el centro de los sistemas haversianos para nutrir a los osteocitos de la osteona.

b) Canales de Volkmann, más cortos y dispuestos en dirección transversal u oblicua, conectan los canales de Havers entre sí y también con la cavidad medular y con la capa exterior del hueso, el periostio. También se encuentran vascularizados.

c) Cavidades de reabsorción. Son huecos temporales creados por los osteoclastos durante la fase inicial de la remodelación. Tienen un diámetro aproximado de 200 μm .

Por su lado, el hueso trabecular o esponjoso tiene una porosidad entre 0.75 y 0.95 y se encuentra en los huesos cortos, en los huesos planos y en los extremos de los huesos largos. Aporta una cuarta parte de la masa esquelética total, pero dos tercios de su superficie. La estructura de este hueso consiste en un conjunto de placas y barras de tejido mineralizado y duro, denominadas trabéculas, de 200 μm de espesor, conectadas entre sí y que dejan poros, ocupados por médula ósea. También tiene laminillas con lagunas ocupadas por osteocitos. La diferencia reside en que al ser delgadas las trabéculas óseas, los vasos no penetran en ellas y no hay verdaderos sistemas de Havers. Los osteocitos se nutren de los vasos próximos del conjunto hematopoyético a través de los canalículos. La distribución de estas trabéculas es muy variable, casi ortogonal en unas ocasiones y aleatoria en otras, pero parece obedecer a un objetivo único, resistir las cargas a las que se encuentra sometido el hueso.⁶

Hueso lamelar y fibroso

Si se examina el hueso cortical y el hueso trabecular a mayor aumento, se puede observar que están compuestos de dos tipos de tejido, lamelar y fibroso:

a) Hueso lamelar, que se forma lentamente y de manera muy organizada. Consiste en una serie de capas o lamelas, que contienen una matriz anisótropa de cristales de mineral y fibras de colágeno. Cuando las lamelas son

cilíndricas se tiene una osteona, como se ha descrito anteriormente. Según Giraud-Guille⁷ existen dos tipos de disposición de las lamelas según la orientación de las fibras de colágeno, que discurren paralelas dentro de cada lamela. En la primera de ellas, las lamelas alternan la orientación de sus fibras a 90°. En otras zonas se produce una variación progresiva de la orientación de una lamela a otra, resultando una disposición helicoidal. La presencia de un tipo u otro puede responder a la necesidad de soportar diferentes estados de carga, para lo que la disposición de las fibras de colágeno es crucial, dando más rigidez al tejido en determinadas direcciones. Así, por ejemplo, la disposición ortogonal es bastante adecuada para soportar tracción en dirección longitudinal, mientras que la disposición helicoidal sería más conveniente si las cargas tienen una orientación variable.

b) Hueso fibroso o “woven bone”. Se forma de manera rápida y poco organizada, con los cristales de mineral y las fibras de colágeno dispuestas aleatoriamente, lo que hace que sea menos rígido y resistente. Para compensar esa falta de rigidez tiene mayor contenido mineral que el hueso lamelar. En contraposición al hueso lamelar, en el que la orientación de las lamelas determina su carácter anisótropo, el hueso fibroso es prácticamente isótropo.

Hueso primario y secundario

El hueso cortical a su vez puede dividirse en primario o secundario según el estado de desarrollo en el que se encuentre.

1) El hueso primario es tejido depositado sobre la superficie ósea, por ejemplo, la del periostio, durante el período de crecimiento. Se distinguen dos tipos:

a) Hueso lamelar primario o circunferencial, en el que las lamelas son paralelas a la superficie del hueso. Los vasos sanguíneos se incorporan al tejido rodeados de unas cuantas lamelas circunferenciales, formando una osteona primaria.

b) Hueso plexiforme. Se forma muy rápidamente con un entramado trabecular de “woven bone” cuyos huecos se rellenan con hueso lamelar. Los espacios residuales que ocupan los vasos le dan un aspecto de muro de fábrica.⁸ Está presente en animales con un crecimiento muy rápido, como el ganado vacuno. En el hombre forma parte del embrión del esqueleto, que va siendo sustituido progresivamente por hueso más maduro, y en el callo óseo después

de una fractura. Así, salvo que exista lesión ósea, no se presenta en el esqueleto humano a partir de los cuatro o cinco años de edad.

2) El hueso secundario resulta de la reabsorción de tejido existente y su sustitución por tejido lamelar, en el proceso de remodelación ósea, que será descrito con detalle más adelante. En el hueso cortical, el tejido viejo es sustituido por osteonas secundarias. Dichas osteonas secundarias sustituyen bien al tejido lamelar primario, bien a otras osteonas anteriores, de las que reabsorben una parte y dejan intacta otra, lo que se conoce como hueso intersticial. En el hueso trabecular también se sustituye el hueso primario por hueso secundario lamelar, más rápidamente que en el hueso compacto, aunque no mediante osteonas, que no cabrían en una trabécula.

Clasificación de los huesos en función de su anatomía

En la mayoría de animales vertebrados se distinguen tres tipos de hueso:

- Huesos largos: Tienen ambos extremos, denominados epífisis, con formas variables y una zona central, la diáfisis, de forma cilíndrica. La transición entre las dos se denomina metáfisis y es de forma cónica. Las epífisis están constituidas por una fina capa de hueso cortical, siendo el interior hueso trabecular con médula ósea roja. La diáfisis consiste en una gruesa capa de hueso cortical en cuyo interior hay inicialmente hueso esponjoso que desaparece con la remodelación, durante el desarrollo del hueso, quedando tejido adiposo que constituye la médula amarilla o tuétano del hueso. Un ejemplo típico: los huesos principales de las extremidades como el fémur.

- Huesos planos: Formados por dos finas capas de hueso compacto entre las que se encuentra una capa de hueso esponjoso en una estructura tipo sándwich. Se caracterizan por la ausencia de epífisis o de diáfisis. Ejemplos de huesos planos: costillas, cráneo, esternón y escápula.

- Huesos cortos y huesos irregulares: La capa externa o cortical es de hueso compacto que rodea una zona central compuesta por hueso trabecular o esponjoso en una estructura similar a la epífisis en los huesos largos. Ejemplos de huesos cortos: huesos del tarso y carpo. Ejemplos de huesos irregulares: vértebras y huesos de la cara.

Clasificación de los huesos en función de su calidad

También cabe considerar una clasificación respecto a la calidad del hueso del paciente que tenga en consideración el grosor del hueso cortical y su dureza. Existen múltiples clasificaciones en cuanto a la calidad y la cantidad de hueso remanente en zonas edéntulas de los huesos maxilares. La más utilizada en la práctica odontológica es la clasificación de Lekholm y Zarb⁹ de 1985.

- Clase I: El hueso se compone casi exclusivamente de hueso compacto homogéneo.
- Clase II: El hueso compacto ancho rodea el hueso esponjoso denso
- Clase III: La cortical delgada rodea el hueso esponjoso denso
- Clase IV: La cortical delgada rodea al hueso esponjoso poco denso.

COMPOSICIÓN DEL HUESO

Matriz extracelular. El hueso es una estructura compleja a nivel microscópico, formada por células y una matriz ósea que las engloba. Dicha matriz está compuesta por un componente orgánico en el cual se encuentra embebida la fase mineral formada por cristales de apatita. La proporción de las distintas fases puede variar considerablemente de un hueso a otro. La combinación de ambas fases es la que brinda al hueso sus especiales propiedades mecánicas de dureza y elasticidad en una estructura relativamente ligera.

Matriz inorgánica. El componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporción de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. El plasma se encuentra sobresaturado de calcio y fósforo respecto a la hidroxiapatita, por lo que debe haber sustancias que inhiban la mineralización. Las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio ATP y pirofosfato la inhiben.¹⁰

Esta componente inorgánica tiene dos funciones esenciales: confiere al hueso gran parte de su resistencia y rigidez y sirve de reserva de iones. De hecho, el 90% del calcio del cuerpo, el 85% del fósforo y la mitad del sodio y el magnesio se encuentran en el hueso. La resistencia mecánica que aporta la

componente inorgánica es principalmente resistencia a la compresión, ya que su resistencia a tracción es muy pequeña y su fragilidad alta. De la resistencia a tracción es responsable la componente orgánica, que además aporta flexibilidad y le da forma al hueso.

Matriz orgánica. La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formado fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90%). La matriz juega un papel importante en el conjunto del sistema óseo, siendo evidente este hecho cuando aparecen enfermedades del colágeno como la osteogénesis imperfecta. Sin embargo, debe considerarse a la matriz mineralizada extracelular como algo más que un reservorio de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo.¹¹

El colágeno. El 90% de la matriz extracelular (MEC) está constituido por colágeno, sobre todo, tipo I (>95%) y tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey tipo XII, formado bajo estrés mecánico. En la molécula de colágeno se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas.¹² Contiene característicamente los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina siendo este último un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno y estando sus valores de excreción urinaria en relación directa con la tasa de reabsorción ósea.¹³

Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de puentes de piridinolina, entre las hidroxilinas y lisinas. Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.¹⁰ Así se encuentran:

Proteínas no colágenas

- Proteoglicanos: constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. Son moléculas de gran tamaño. En la matriz osteoide hay cuatro tipos de proteoglicanos como Hialuronano y Condroitín-sulfato, ambos de molécula grande e intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea y biglicano

y decorina: de molécula mas pequeña, que aparecen en las fases siguientes de la formación ósea.¹⁰

- Proteínas con ácido Y-carboxi-glutámico: son la osteocalcina (OCN) y la proteína de la matriz con ácido Y-carboxi-glutámico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina D para su síntesis. La osteocalcina es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependientes de la vitaminaD y K. Representa el 15% de las proteínas no colagenas de la matriz y contiene tres restos de ácido Y-carboxi-glutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y la actividad de los osteoblastos.¹⁰

- Glicoproteínas: son la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripéptido RGD. La osteonectina es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células. En el hueso es necesaria para la mineralización normal. La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. Existen varias isoenzimas y entre ellos la ósea, se ha considerado un buen marcador de la actividad osteoblástica. Las proteínas con tripéptido RGD, también llamadas SIBLINGS (small Integrin Binding Ligand, N-Linked Glycoprotein) son fundamentalmente cinco: osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son glicoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración ósea, con una secuencia RGD que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y los osteoclastos ($\alpha v \beta 3$, entre otras). También actúan como receptores de superficie de las células óseas, permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales.¹⁰

- Proteínas procedentes del plasma: Se encuentra en la matriz orgánica ósea en mayor proporción que en el plasma. Son la albúmina y la $\alpha 2$ -SH-glicoproteína, probablemente relacionadas con la incorporación de calcio a la matriz osteoide.¹⁰

- Factores de crecimiento: son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas, etc.) que intervienen

en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina.¹⁰

Agua. El agua que contiene el hueso se encuentra formando parte de la médula ósea que rellena los poros, o bien contenida en el tejido, en este caso ligada al colágeno. El hueso recién formado, denominado osteoide, está constituido principalmente de componente orgánica y agua, atrapada entre el colágeno. Esta es sustituida por mineral de forma progresiva, en el proceso denominado mineralización ósea.

CÉLULAS

Entre ellas se pueden distinguir:

Osteoblastos. Los osteoblastos son las células responsables de la formación de hueso. Estas células sintetizan los componentes de la matriz orgánica y controlan la mineralización de la misma.¹⁴ Son células grandes (20-30µm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático rugoso de tamaño importante.¹⁵ Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos. Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre si por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre otras células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como el calcio, citoquinas o prostaglandinas. En estas células la conexión intercelular es la Conexina 43.¹⁶

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 µm por día y expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina (ALP) que permite la mineralización a un ritmo de 1-2µm por día. Actualmente se sabe que 1 - sintetizan las proteías colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, 2 - dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, 3 - contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la ALP, 4 - median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y 5 - sintetizan factores de crecimiento.(Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil et al. 2006) Tienen una vida medio variable entre una a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento (bone lining cells) o en osteocitos (15%). Ambos tipos

celulares representan estadios más avanzados de maduración. Las células limitantes son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso, sin apenas organelas. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos anteriormente citados como sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina y ALP así como receptor de paratohormona (PTH). Permanecen a lo largo de la superficie endóstica, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo.¹⁰

Osteocitos. Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en osteocitos. Los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes se hallan en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas y los procesos citoplasmáticos se comunican entre si a través de los conductos calcóforos, que están llenos de fluido óseo extracelular. De esta forma, los osteocitos se organizan formando un sincitio de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse oxígeno y nutrientes.¹⁰

Cuando se produce un trauma en el hueso, el cese de la circulación sanguínea origina hipoxia y necrosis de los osteocitos que estén a más de 0.1mm. de un capilar intacto.¹⁷ Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno conocido como mecanotransducción.¹⁸ Asimismo, los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tiene como marcador específico el CD44, receptor de membrana que expresa fuertemente en los osteocitos y es negativo en los osteoblastos y células limitantes.

Osteoclastos. Los osteoclastos, son las células encargadas de la reabsorción ósea. Se trata de células grandes (100µm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Contienen fosfatasa ácido tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto in vivo como in vitro. Además tiene receptores para

calcitonina. Los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos.¹⁹

Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el ribete en cepillo sellando los bordes del área mediante las integrinas. La integrina del osteoclasto, particularmente $\alpha\beta3$, reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) existente en el colágeno y otras proteínas de la matriz osteoide. A este nivel el pH es ácido, ya que secretan ácidos (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, glucuronidasa, etc. que van a originar la reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después.¹⁹

Respecto a la osteoclastogénesis actualmente se sabe que los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos. Así, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas. Los conocimientos actuales acerca de la regulación de la osteoclastogénesis se basan en la existencia de 3 moléculas clave: OPG (osteoprotegerina, proteína sintetizada por los osteoblastos y pre-osteoblastos), RANKL (ligando situado en la superficie de osteoblastos y preosteoblastos) y RANK (receptor del anterior situado en la membrana de osteoclastos y preosteoclastos).¹⁰ El RANKL (receptor activator of NF κ B ligand) antiguamente llamado ODF (osteoclast differentiation factor)²⁰ es una citoquina transmembrana perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF).²¹ La interacción entre RANKL y su receptor RANK produce una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la reabsorción. Así mismo, los efectos del RANKL tanto in vivo, como in vitro son inhibidos por la osteoprotegerina (OPG), proteína circulante producida por los osteoblastos y preosteoblastos perteneciente a la superfamilia de los receptores TNF. Cuando se unen OPG y RANKL se inhibe la unión de RANKL a RANK y se inhibe la diferenciación osteoclástica. Por ello OPG, RANK y RANKL son importantes reguladores de la osteoclastogénesis.¹⁰

PROPIEDADES MECÁNICAS DEL HUESO

Dada la amplia gama de movimientos del cuerpo, los huesos pueden estar sometidos a diversos tipos de fuerza, ya sea de compresión, tracción o cizalladura. El hueso cortical es el responsable de resistir la mayor parte de la carga a la que se ven sometidos los huesos, y trabaja tanto a compresión, como a tracción y a cizalladura. Por su parte, el hueso trabecular, que tiene entre otras características como la de proporcionar ligereza a los huesos sin detrimento de su solidez, trabaja fundamentalmente a compresión.³

Por otro lado, los factores que influyen en las propiedades mecánicas del hueso son la localización concreta del hueso, la edad del espécimen o si éste sufría algún tipo de enfermedad. Además, los valores registrados en los ensayos mecánicos vienen influidos por las condiciones experimentales, tales como temperatura, grado de humedad, o si ha sido congelado para su conservación entre otras.³ En esta línea, las propiedades mecánicas de los huesos, formados fundamentalmente por tejido cortical, dependen de la dirección de aplicación de la carga. Los huesos largos son materiales ortotrópicos. En el plano transversal al eje longitudinal las propiedades elásticas son inferiores que, en el eje longitudinal, dirección paralela al eje de las osteonas. Asimismo, la resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica de manera vertical al eje del longitudinal, mientras que cuando la fuerza actúa de forma oblicua el hueso se fractura con mayor facilidad.³

A un nivel elemental, el esqueleto óseo determina la estructura del cuerpo, organizando sus componentes en el espacio. A un nivel mecánicamente más sofisticado, los huesos y sus articulaciones transmiten fuerzas de una parte a otra del cuerpo. Finalmente, los huesos permiten la locomoción. Consecuentemente la biología ósea esta dirigida por la mecánica.²²

Problemas mecánicos en relación con el hueso Es habitual considerar tres problemas mecánicos a los esqueletos vertebrados:²²El hueso es metabólicamente caro de movilizar por parte del sistema muscular, fundamentalmente debido a su alta densidad.

a) El problema Galileo. Como la tensión en una determinada estructura cargada es la fuerza aplicada por unidad de sección de área y como

las fuerzas que actúan sobre el esqueleto de un vertebrado se debe principalmente a su propio peso, si los huesos de los vertebrados más grandes mantuvieran la misma proporción entre su anchura y su altura que los de los animales más pequeños, el estrés generado en ellos incrementaría de forma proporcional a su tamaño. Por ese motivo, tal y como Galileo Galilei había comprobado, los huesos de los grandes vertebrados presentan unos diámetros grandes respecto a sus longitudes, precisamente para mantener el estrés en niveles tolerables.

Pues bien, una manera de reducir el tamaño y la masa ósea de forma relativa al resto del cuerpo, es crear una estructura interna eficaz, que pueda ser ligera. Esta es la estructura trabecular ósea, creada y mantenida por los equipos de células que Frost denominó como Unidades Básicas Multicelulares (BMUs), encargadas de eliminar y reponer pequeños volúmenes de hueso.

b) El hueso posee grietas o zonas de microrrotura. Las grietas en la materia estructural son irregularidades microscópicas o moleculares que constituyen zonas de debilidad local y que tienden a iniciar fracturas cuando el cuerpo se carga mecánicamente. Se entiende que cuanto más grande sea el volumen de hueso, mayor la probabilidad de que exista una grieta que inicie una fractura. La primera persona que escribió acerca de la relación inversamente proporcional entre el tamaño y la fuerza fue Leonardo da Vinci, que demostró que los volúmenes grandes son más propensos a fallar ante aplicaciones de estrés menor, que los volúmenes pequeños. Martin y Burr, determinaron que la probabilidad de que las microrroturas (cracks) y los espacios de reabsorción en el hueso están asociados, depende en gran medida del factor F , que da cuenta de la posibilidad de que algunas osteonas que contienen ambos, una rotura y una zona de reabsorción, compartan una línea de cemento con la osteona adyacente, a la cual probablemente la rotura pertenezca. F depende entonces de los criterios de medida para las roturas y los espacios de reabsorción, la densidad de osteonas presentes en el hueso y los mecanismos por los cuales las roturas dan inicio a un remodelado. El teórico número de osteonas que pueden contener ambos, rotura y espacio de reabsorción (n máx.), se incrementa cuando también aumentan el número de espacios de reabsorción (r), el número de roturas (c) y el factor F , pero disminuye cuando la densidad de la población de osteonas (d) aumenta. Un n máx. mayor hace que la asociación directa entre las roturas y los espacios de reabsorción resulte más difícil de demostrar.⁸ Pues

bien, para que cualquier cuerpo sólido se rompa, es imprescindible que previamente se deforme lo suficiente para resquebrajarse en algún punto de su superficie por estiramiento excesivo.^{8,23} Este principio explica que la regulación de la rigidez ósea, entendida esta como la resistencia a la deformación, haya surgido durante la evolución como un objetivo biológico primario, quedando determinada la resistencia a la fractura como un efecto colateral.

Efecto de las cargas sobre el hueso. El efecto de la carga mecánica sobre el hueso fue descrito por primera vez por Julius Wolff²⁴ en 1892, en su “Ley de la transformación del hueso” (Law of bone transformation), en la que postulaba que cada cambio en la función del hueso originaba cambios en la conformación externa e interna de ese hueso. Este proceso es lo que se conoce como adaptación ósea. Diferentes mecanismos se han considerado como responsables de gobernar los estímulos adaptativos, como por ejemplo el estrés, la tensión y la energía de deformación.²⁵ Harold Frost²⁶ en 1983 introdujo el concepto de MES (Minimum effective strain) - Mínima tensión efectiva, como el mínimo nivel de tensión que debe ser superado para inducir la adaptación del hueso. Lanyon y cols.²⁷ y Rubin y cols.²⁸ determinaron que no solo el nivel de tensión, sino el porcentaje de cambio de tensión, el número de ciclos de tensión y los cambios en la distribución de la tensión, influían sobre esta respuesta del hueso.

Durante las últimas décadas del siglo XX, numerosos estudios experimentales demostraron que el paradigma de Wolff tendía a simplificar la realidad de la biología ósea. El remodelado óseo inducido mecánicamente no puede contemplarse independientemente de los otros factores determinantes. Consecuentemente, las leyes matemáticas que intentan explicar la adaptación del hueso en general, fallan a la hora de explicar las numerosas incógnitas que aún están vigentes.²⁵ Además, la respuesta del hueso frente a condiciones alteradas de carga depende de la localización anatómica, según los trabajos de Bertram y Swartz.²⁹ En resumen, dado que el hueso debe soportar cargas compresivas y de flexión, está sujeto a fatiga, cuya acumulación puede conducir a fracturas.³⁰ podemos distinguir dos factores determinantes de la rigidez y la resistencia a la fractura de cada hueso:

a) La calidad mecánica de su material calcificado (rigidez intrínseca del hueso, independiente de la forma del hueso)

b) Su distribución espacial, que incluye su masa, pero también la forma, el tamaño y la macroestructura del órgano de sostén (diseño del hueso, independiente de su calidad).^{23,31}

Completado el crecimiento en largo, existen sólo dos mecanismos fundamentales del desarrollo óseo capaces de modificar la calidad y/o la distribución del material óseo mineralizado: el modelado y el remodelado óseo.³²

Modelado y remodelado óseo. Los huesos no son estructuras estáticas, están cambiando continuamente incluso en personas adultas. Durante la infancia se produce un aumento de tamaño de los huesos, tanto en longitud como en diámetro, acompañado de otros cambios, para esculpir su forma definitiva. Este proceso fue denominado por Frost “modelling” y se ha traducido como remodelación ósea externa (ROE).³³ Estos cambios no son exclusivos de la infancia y pueden darse también en otras circunstancias, principalmente de tipo traumático. Así por ejemplo, Lanyon y cols.²⁷ observaron en ovejas adultas que al extirparles el cúbito, el radio cambiaba de forma y se engrosaba en la zona próxima al lugar donde antes estaba el cúbito, para compensar en cierta forma su ausencia. Ese cambio de forma conlleva reabsorción en determinadas zonas y formación en otras, que pueden ocurrir de forma independiente.

El modelado óseo consiste en una combinación no acoplada (en distintos sitios) de aposición osteoblástica de hueso nuevo y destrucción osteoclástica de hueso preexistente. Su balance global de masa es generalmente positivo y es la única forma genuina de ganar masa ósea.³⁴ En una persona adulta que no haya sufrido trauma alguno también se producen cambios. El hueso está en continua evolución, reparando el daño que la actividad diaria pueda producir en él por fatiga. También se adapta a los cambios que dicha actividad diaria pueda experimentar. Para ello se retira el hueso antiguo y se forma hueso nuevo, con una actividad coordinada de osteoclastos y osteoblastos. Frost denominó “remodelling” a este proceso, que se ha traducido como remodelación ósea interna (ROI).³³ No obstante, las diferencias entre remodelación ósea interna y externa son las siguientes:

a) La ROE requiere la acción de osteoblastos y osteoclastos, pero de forma independiente, mientras que en la ROI esa actividad es secuencial y coordinada como se verá más adelante.

b) La ROE produce cambios de forma y/o de tamaño en el hueso, mientras que la ROI normalmente no afecta ni a la forma ni al tamaño.

c) La velocidad de la ROE decrece con la edad a la vez que los huesos van madurando. La ROI ocurre durante toda la vida, aunque también se ve frenada una vez acabado el crecimiento.

d) La ROE es un proceso continuo y prolongado mientras que la ROI ocurre de manera episódica, con un principio y un final claro en cada punto de remodelación.

La remodelación es un proceso acoplado de remoción osteoclástica de pequeñas cantidades de hueso preexistente, que es repuesto total o parcialmente por formación osteoblástica en el mismo sitio, con balance de masa consecuentemente neutro o negativo.³² El mecanismo es útil porque provee la homeostasis mineral, reemplaza tejido viejo por nuevo y repara zonas microdañadas.³² Efectivamente, los daños por fatiga en el hueso activan y aparentemente son a su vez limitados, por el fenómeno del remodelado. Está demostrado que cuando se generan microfracturas por fatiga de manera experimental en hueso vivo, la remodelación ósea se inicia de forma espacial y temporal en proximidad a ellas y de hecho también se ha comprobado de manera experimental que el remodelado es el único mecanismo capaz de recuperar los daños por fatiga que se generan en el hueso.³⁰ La ROI tiene lugar durante toda la vida y no sólo durante el período de crecimiento.

Según Currey,³⁵ el hueso es una estructura óptima desde el punto de vista de la resistencia, porque consigue la máxima rigidez con el mínimo peso. Ese es uno de los objetivos de la ROI: adaptar la estructura ósea para conseguir la máxima eficiencia. El remodelado es por tanto fundamental en la biología ósea. Es un proceso realizado en dos etapas: una de reabsorción y otra de aposición ósea. Estos procesos están conectados temporalmente y se caracterizan, tal y como demostraron Burr y cols.,³⁶ por la presencia de las denominadas unidades óseas multicelulares (Bone Multicellular Units), también conocidas como Unidades Básicas Multicelulares.^{2,33,36}

Una BMU está formada por:

a) Un frente osteoclástico residente en una superficie de hueso recién resorbido, que constituye el frente de resorción.

b) Un compartimiento que contiene vasos y pericitos.

c) Una capa de osteoblastos presentes en una matriz orgánica neoformada, que constituye el frente de depósito.

Además, en el control del remodelado óseo están involucrados los estímulos locales y la liberación de hormonas como la paratiroidea (PTH), la hormona del crecimiento, la leptina y la calcitonina.¹⁴ Por tanto, durante el remodelado, la reabsorción de una zona de hueso por los osteoclastos se continúa con el relleno de la cavidad creada por los osteoblastos. Esta secuencia requiere un período de tiempo de 3-4 meses para que se complete cada localización de remodelado y las cavidades de reabsorción y relleno, aunque son individualmente pequeñas, colectivamente suponen una sustancial porosidad o espacio de remodelado en el hueso, de carácter temporal. Si el propósito del remodelado es el de eliminar masa ósea, estos espacios de remodelado no tienen consecuencias, pero si el objetivo es el de eliminar tejido dañado, esta porosidad temporal puede debilitar la estructura. Es por ello esencial que el proceso de remodelado óseo sea entendido no solo como un proceso biológico fundamental, sino en el contexto de la función de soporte de carga del hueso. Así mismo es importante que la adaptación mecánica del hueso y su resistencia a la fatiga sea entendida en el contexto del remodelado.³⁷

A su vez, durante mucho tiempo se ha defendido la idea de que el incremento en la acumulación de los microdaños en la estructura ósea, como resultado de la aplicación de cargas cíclicas, puede ser a su vez el resultado de un incremento de la mineralización del tejido, que ocurre secundaria a una supresión del remodelado y que puede convertir al hueso en más frágil y quebradizo.^{38,39} El hueso está formado por componentes orgánicos y minerales, principalmente colágeno tipo I y apatita nanocristalina. La estructura exacta de la apatita no es del todo conocida, porque se producen sustituciones en las zonas catiónicas del calcio y en las aniónicas del fosfato. Estas sustituciones pudieran afectar a las propiedades químicas y físicas del hueso, como la solubilidad, densidad, dureza, y morfología. Una de las sustituciones aniónicas más frecuentes es la del Carbonato (CO₃²⁻). Se ha observado que la sustitución del carbonato tiende a reducir la estabilidad de la hidroxiapatita, convirtiendo al hueso mineral en más soluble. Se ha determinado que el contenido de carbonato estaba significativamente disminuido en las zonas del hueso que presentaban microrroturas. Parece ser que durante el proceso de formación de las microrroturas, los cristales minerales son desplazados de la matriz de colágeno.

Como los cristales de apatita carbonatada son más solubles que los de apatita no carbonatada, resulta lógico el descenso del contenido de carbonato en el mineral del hueso. Otro ion frecuentemente sustituido del entramado de la apatita es HPO_4^{2-} . Este ion está frecuentemente presente a altas concentraciones en huesos de personas jóvenes y decrece con los años; en las zonas de micro roturas está presente en una cantidad mayor. Las modificaciones en la cantidad de los dos iones comentados en las zonas de microrrotura parecen avalar la teoría de que las modificaciones en la mineralización del hueso lo pueden convertir en más frágil y sensible a las microrroturas, sin embargo, pese a las modificaciones de esos iones, en esas zonas el ratio de mineral fosfato/proteínas no se ve afectado, de modo que la asociación no está clara.⁴⁰

Por otro lado, parece haber consenso en que la calidad y estado de maduración del colágeno, que forma la matriz donde se deposita el mineral, sí pudiera desempeñar un papel importante en la iniciación y propagación de las microrroturas, puesto que ambos factores influyen directamente en la plasticidad y ductilidad del tejido óseo.^{41,42} Por tanto, como hemos apuntado, el remodelado tiene dos funciones fundamentales, el control del peso, eliminando aquellas zonas de hueso insuficientemente cargadas y en segundo lugar la eliminación de los daños acumulados por la acción de las cargas, previniendo de esta forma las fracturas por fatiga.³⁷ Efectivamente, existe importante evidencia experimental acerca de que la remodelación se activa por el desuso⁴³ y el microdaño por fatiga,^{8,36,44} así como por ciertos factores químicos como la deficiencia de estrógeno y otros efectos hormonales, nutrición e influencias neuronales.²⁹

De esta manera, distintas modulaciones direccionalmente orientadas de la modelación y la remodelación permitirían a cada hueso autorregular la rigidez y con ella la resistencia, de su estructura.² Esto resulta posible gracias a que los osteocitos, únicas células intrínsecas a la matriz calcificada en la cual están inmersos, sentarían direccionalmente las minideformaciones que el uso cotidiano provoca en este material. Los osteocitos podrían orientar así la liberación de distintos factores de comunicación célula-célula que, a través de sus prolongaciones, alcanzarían a osteoblasto y osteoclastos extrínsecos a la estructura calcificada, para inhibirlos o estimularlos localmente, en función de la orientación determinada por la gravedad y las contracciones musculares, optimizando permanentemente la rigidez y con ello la resistencia del tejido

mineralizado y del hueso entero.^{18,45} Según el cuerpo hipotético conocido como “Paradigma de Utah”,⁴⁶ el objetivo del mecanismo así descrito, denominado por Frost como Mecanostato óseo,² parece mantener la deformabilidad de la estructura ósea muy alejada del nivel crítico para que el uso cotidiano no pueda llegar a producir una fractura (1-2 vs 20-25 milésimas de variación de la longitud de reposo para esfuerzos fisiológicos máximos, para todos los huesos de todos los vertebrados), en forma específica para cada sitio. Deformaciones reiteradamente mayores de 2 milésimas dispararían normalmente la incorporación moderatoria de material nuevo en el sitio preciso para reducir esa deformabilidad. Inversamente, deformaciones reiteradamente bajas determinarían el giro de la remodelación local del modo conservativo al modo desuso, eliminando el material en el sitio preciso para aumentar esa deformabilidad. Se tiende a aceptar que autocontrolando de esta forma la rigidez, el mecanostato determinaría indirectamente la resistencia de la estructura ósea, dentro de límites bastante amplios.⁴⁶

IMPLANTOLOGÍA ORAL

La primera prótesis de la que se tiene constancia, no es un diente natural o artificial sujeto a los dientes vecinos, como se ha encontrado en cráneos egipcios o fenicios, si no que es una implantación necrópsica realizada durante el neolítico (hace 9000 años). El cráneo encontrado era de una mujer joven que tenía un trozo de falange de un dedo introducido en el alveolo del segundo premolar superior derecho.⁴⁷ Los restos antropológicos más remotos de implantes dentales, colocados in-vivo son los de la cultura maya. El arqueólogo Popenoe en 1931 descubrió en la Playa de los Muertos en Honduras, un cráneo que presentaba en la mandíbula tres fragmentos de concha introducidos en los alveólos de los incisivos. Este cráneo data del año 600 d.C. Los estudios radiológicos determinaron la formación de hueso compacto alrededor de los implantes, haciendo suponer que dichos implantes se habían colocado en vida.^{47,48}

A principios del s. XIX se llevó a cabo la colocación de los primeros implantes metálicos intra-alveolares destacando a Maggiolo⁴⁹, que en 1809 introdujo un implante de oro en el alveolo de un diente recién extraído. Así mismo, en las primeras décadas del siglo XX Payne presentó la técnica de

implantación en el 3er Congreso Dental Internacional, utilizando una cápsula de plata colocada en el alveolo de una raíz.⁴⁷ No obstante, fue en 1978 cuando se presentaron los estudios experimentales del grupo sueco de Göteborg dirigido por P.I. Bränemark y T. Albrektsson.⁵⁰ En 1952, el profesor Bränemark comenzó a realizar una investigación con estudios microscópicos in-vitro de la médula ósea en tibia de conejo, para conocer mejor la vascularización tras un traumatismo óseo. El estudio se llevó a cabo introduciendo una cámara de titanio en el hueso del conejo, tal y como se observa en la **Figura 1**. La sorpresa surgió cuando al ir a retirar la cámara se comprobó que era imposible, ya que la estructura de titanio se había incorporado por completo al hueso, y el tejido mineralizado era totalmente congruente con las microirregularidades de la superficie del titanio. A este hecho se le denominó “osteointegración” y a partir de ese momento se comenzó a realizar estudios para rehabilitar animales edéntulos, que resultaron eficaces, por lo que surgió la idea de crear un sustituto para la raíz de los dientes que estuviera anclado en el hueso maxilar.⁵¹

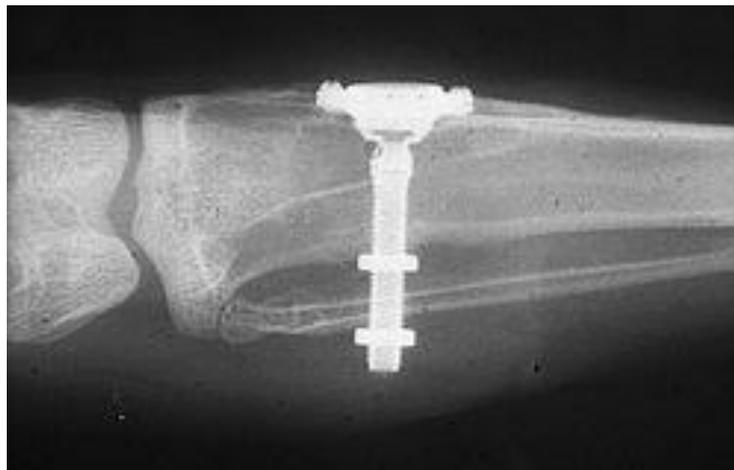


FIGURA 1: *Radiografía del espécimen del estudio de Branemark, que muestra la cámara óptica de titanio fijada a la tibia y el peroné del conejo.*

Así, la introducción de los implantes en la odontología ha permitido a los odontólogos realizar tratamientos protésicos fijos, incluso en casos de pérdida de varios dientes o dientes estratégicamente importantes y en consecuencia, evitar en muchos casos el empleo de prótesis removibles.⁵² Tras el descubrimiento de los implantes dentales osteointegrados con los trabajos de Bränemark^{1,53} y Schroeder,⁵⁴ se posibilitó la rehabilitación de cualquier edentulismo con una alta predictibilidad. Por esto, hoy en día, una de las

opciones más indicadas para solventar la pérdida de uno o más dientes suele ser una prótesis soportada y/o retenida sobre implantes dentales, ya que es una opción con resultados altamente predecibles a largo plazo.⁵⁵ En este sentido, y gracias a los avances en la materia, es posible resolver casos cada vez más extremos o de una complejidad mayor, tanto en edentulismo parcial como total, mediante la utilización de implantes dentales. Podríamos afirmar que los implantes dentales han pasado de ser la excepción a ser uno de los tratamientos más utilizados en rehabilitación de dientes perdidos.⁵²

La implantología es hoy una técnica con base científica y con lejanos antecedentes históricos, que ha ido evolucionando por la constante necesidad de resistir la pérdida dentaria. Por tanto, hoy en día los implantes dentales endoóseos son dispositivos que se insertan en el hueso maxilar para reponer dientes naturales perdidos. La prótesis fija (coronas o puentes) se unen a los implantes, una vez osteointegrados para resistir la función masticatoria.⁵² Podemos definir entonces la rehabilitación mediante prótesis fija implantosoportada como aquel sistema formado por el implante dental, el hueso periimplantario y la restauración protésica (pilar protésico y corona).⁵² Pero para que todo este conjunto funcione adecuadamente se necesita una buena unión del hueso al implante, lo que se conoce como osteointegración.

Osteointegración. La osteointegración fue definida por primera vez por Brånemark en 1985 como “la conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo y la superficie de un implante de titanio sometido a carga”.⁵⁰ Posteriormente, es definida en 1993 por The Academy of Prosthodontics como “la unión aparentemente directa del tejido óseo con un material aloplástico inerte sin la intervención del tejido conectivo”. Actualmente, se considera el fenómeno de aposición directa de hueso sobre una superficie implantaria, la cual es sometida a una adaptación estructural en respuesta a una carga mecánica.⁵⁶

Mecanismos de osteointegración. La osteointegración, al igual que la curación de cualquier herida, tiene 4 fases: hemostasia, fase inflamatoria, fase proliferativa, y fase de remodelación.

-1. Hemostasia: comienza con el trauma provocado por el fresado óseo previo a la colocación del implante. La duración de esta fase va desde minutos hasta horas. Las proteínas de la matriz, y los factores de crecimiento y de

diferenciación almacenados en la matriz ósea se convierten solubles y se activan. Inmediatamente después de la colocación del implante, su superficie interactúa con las moléculas de agua y los iones, lo que puede provocar el cambio de potencial de la superficie del implante y los iones bivalentes como el calcio pueden unirse a las superficies con carga negativa. En este momento se empiezan a depositar proteínas sobre la superficie del implante. Una vez se han depositado estas proteínas sobre la superficie implantaria, las células ya se pueden unir a ella. Finalmente, la degranulación plaquetaria dará lugar al inicio de la fase inflamatoria.⁵⁷

-2. Fase inflamatoria: comienza aproximadamente a los 10 minutos tras la cirugía y se mantiene durante los primeros días. Esta fase tiene lugar cuando empieza la degranulación plaquetaria. Estas liberan factores de crecimiento, bradiquinina (que aumenta la permeabilidad vascular) e histamina (que disminuye la velocidad del flujo sanguíneo e induce hiperemia). En esta fase se produce una vasodilatación clínicamente detectable, tumefacción y aumento de la temperatura en la zona de la herida. En el momento inicial de esta fase se activa la respuesta inmune innata (leucocitos polimorfonucleares y el sistema del complemento). Esta fase inflamatoria inicial que se da en las 3 primeras horas es crucial para el destino de la herida. Cuando se consigue la eliminación bacteriana y de los restos de tejido, los macrófagos secretan factores de crecimiento fibrogénicos y angiogénicos y se produce una activación de los fibroblastos, que, mediante una serie de mecanismos, son capaces de llegar al área de la herida y dan lugar al comienzo de la fase proliferativa.⁵⁷

-3. Fase proliferativa: esta fase se caracteriza por la formación de nueva matriz extracelular y angiogénesis. Se forma tejido de granulación. Esta fase durará entre días y pocas semanas. Estimulados por los factores de crecimiento de fibroblastos secretados por los macrófagos, los fibroblastos de los tejidos sanos circundantes migran al interior del coágulo sanguíneo. Estos fibroblastos crean túneles a través de la matriz extracelular provisional de la fibrina del coágulo mediante la secreción de metaloproteinasas de la matriz y van reemplazando esta matriz provisional. De forma paralela, se estimula la angiogénesis mediante hipoxia, que atrae a los macrófagos, los cuales expresan factores de crecimiento endotelial, que estimulan la producción de precursores de células endoteliales. Por otro lado, los pericitos eliminan la lámina basal de los vasos. Se van creando tubos mediante la organización de las células

endoteliales y finalmente estos se conectan a vasos ya existentes creándose una nueva anastomosis vascular a través de la cual puede empezar a discurrir el flujo sanguíneo. La angiogénesis es condición *sine qua non* para que se dé la osteogénesis. Sólo se formará nuevo hueso en contacto directo con los vasos sanguíneos. Las células de hueso maduro no son capaces de sobrevivir a más de 200 µm de un vaso sanguíneo. Además, la neoformación ósea necesita de un ambiente mecánicamente estable. Las células osteoprogenitoras se adhieren a la superficie de los implantes a través de integrinas. Las integrinas se unen a su vez a proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina; de modo que las células óseas no se unen de forma directa a la superficie del implante, sino que lo hacen a las proteínas que se adhieren a ésta. Tras la unión firme a la superficie implantaria, las células osteoprogenitoras pasan a su forma activa convirtiéndose en osteoblastos, los cuales comienzan a expresar fosfatasa alcalina y osteocalcina. Es importante una íntima unión entre implante y hueso, con un mínimo micro-movimiento entre las partes para evitar una fibrointegración de los implantes. En la primera semana tras la colocación del implante comienza la neoformación ósea. El hueso que se forma tras la creación de la herida es tejido óseo reticular, el cual se caracteriza histológicamente por la disposición disparelela de sus fibras colágenas, orientadas de manera aleatoria. Este tejido óseo crece a lo largo de las superficies óseas ya existentes y de las superficies de los implantes hacia los valles de las espiras. La neoformación ósea comienza por la secreción de matriz colágena por parte de los osteoblastos. En un inicio se secreta colágeno tipo III (debido a que en los alveolos maxilares se produce un proceso de osificación intramembranoso). Finalmente, esta matriz se mineralizará por la hidroxapatita.⁵⁷

-4. Fase de remodelación: durante esta fase el tejido óseo reticular es eliminado por los osteoclastos y es reemplazado por hueso lamelar, cuyas fibras colágenas en este caso se orientan de forma paralela. Los osteoclastos aparecen en la herida a los pocos días. Esta fase puede durar años, produciéndose de forma constante una neoformación ósea orientada a la carga. El hueso lamelar, se fija a las crestas de las espiras del implante. Los osteoclastos y osteoblastos interactúan de manera dependiente. El llamado balance óseo es necesario, ya que, si no, el esqueleto se volvería más poroso (osteopénico) o demasiado denso (osteopetroso). Inicialmente, la acción de los osteoclastos depende del osteoblasto, que controla la osteoclastogénesis

mediante el balance entre RANKL y osteoprotegerina, ambos producidos por el osteoblasto. Estos secretan RANKL, ligando de RANK, receptor que activa la osteoclastogénesis. RANKL puede ser anulado por osteoprotegerina soluble, también sintetizada por los osteoblastos. De este modo, la osteoprotegerina inhibe la osteoclastogénesis. La unidad principal del hueso es la osteona, formada por capas concéntricas de hueso camelar neoformado con un conducto central, que contiene un vaso sanguíneo principal, llamado conducto de Havers. Como decíamos, este hueso neoformado se orienta en función de la carga. Los estímulos mecánicos se traducen en una señal mediada por citoquinas que controlan la acción del osteoblasto. Este fenómeno, denominado mecanotransducción, es mediada por el osteocito. Éste, posee estrechas prolongaciones citoplasmáticas conocidas como canalículos, a través de los cuales discurre líquido intersticial. Las cargas que se trasladan al hueso provocan cambios de gradiente en este fluido estimulando los cilios primarios de la membrana celular induciendo señales intra-celulares. Estas señales se propagan a los osteocitos vecinos mediante sus conexiones celulares. Además, los osteocitos también pueden inhibir a los osteoblastos a través de la esclerostina.⁵⁷

Asimismo, hay varios factores que pueden afectar negativamente a la osteointegración. En 1981, Albrektsson y cols.⁵⁸ identificaron 6 de ellos: el estado del lecho implantario, las condiciones de carga, la técnica quirúrgica, el macrodiseño del implante, el tipo de superficie y el material del implante.

Factores condicionantes de la osteointegración

Estado del lecho óseo. Para asegurar la correcta osteointegración de un implante, es necesario contar con un lecho óseo implantario sano y con un buen aporte sanguíneo. Además, este está condicionado por el estado de salud del paciente, hábitos tabáquicos y medicaciones previas y actuales.⁵⁹ Respecto al área ósea receptora, se ha hablado mucho durante los últimos años, ya que es necesario contar con un hueso con suficiente densidad, que nos asegure una buena estabilidad implantaria, y con una buena calidad, que permita un correcto aporte sanguíneo y recambio celular para orientar las trabéculas óseas en función de la carga.⁶⁰

Las diferencias en la macro-arquitectura ósea han dado lugar a diferentes clasificaciones de los tipos de hueso en implantología en función de la proporción de hueso cortical y trabecular, donde el hueso tipo I es un hueso predominantemente cortical, como en el área mandibular anterior, y el hueso tipo IV principalmente trabecular, como en el maxilar posterior.^{9,61} Podemos usar esta clasificación para establecer criterios de calidad ósea mecánica, ya que en huesos con mayor proporción cortical conseguiremos una mayor estabilidad inicial de nuestros implantes, sin embargo, los huesos tipo IV, poseen una mayor vascularización, recambio celular e índice de remodelación ósea, características que hacen de este tipo de hueso, un tejido biológicamente más activo.⁶⁰

Un estudio de experimentación animal concluyó que se conseguía una osteointegración más eficiente en huesos tipo III comparando con huesos tipo I en modelos murinos. Se encontró una mayor proliferación celular, mayor índice de remodelación y mayor número de células osteoprogenitoras y mayor señalización Wnt, indicadores de una rápida curación de la osteotomía y una rápida osteointegración en comparación con los huesos tipo I.⁶²

Tiempo y condiciones de carga. Albrektsson y cols.⁵⁸ en 1981, determinaron que someter un implante a carga antes de los 3-4 meses de su colocación podría comprometer su osteointegración. Hoy en día, se considera que la carga inmediata y temprana de los implantes no impide su correcta osteointegración.^{63,64} Para que esto suceda, los implantes no pueden sobrepasar el umbral de micro-movimiento estimado entre 100-150 μ m,^{65,66} el cual es directamente dependiente de la estabilidad primaria que alcance ese implante durante su inserción. Esto se comentará en profundidad más adelante.

Técnica quirúrgica. Es necesario realizar una técnica quirúrgica lo menos invasiva posible con un manejo correcto de tejidos duros y blandos. Se debe mantener el campo aséptico, refrigerar las fresas durante la preparación del lecho para evitar la necrosis ósea y mantener el aporte sanguíneo.⁵⁹ Un exceso de calor durante el fresado provocaría daños en el recambio óseo causando hiperemia, necrosis, fibrosis, degeneración osteocítica y aumento de la actividad osteoclástica. Se ha comprobado que temperaturas entre 56^o-70^o C son perjudiciales para el hueso, debido a que se provoca la desnaturalización de la fosfatasa alcalina. Además, si se mantiene una temperatura de entre 44-47^oC

se provocará también daño en el tejido óseo, considerándose que el límite para evitar la necrosis ósea son 47°C.⁶⁷ Los factores relativos al operador que provocan el aumento de temperatura del hueso durante el fresado del lecho son: la presión ejercida, el estado de las fresas, los movimientos durante el fresado, y la velocidad y el tiempo de fresado. En cuanto al fabricante influyen el diseño y el filo de las fresas, el sistema de implantes, y el sistema de irrigación. Respecto al hueso donde va a ser colocado el implante, tienen influencia el grosor de la cortical y la densidad ósea, así como la profundidad de fresado.

No obstante, tampoco se han encontrado diferencias a nivel de pérdida ósea marginal en los casos en los que se usa un protocolo de fresado consistente en múltiples pasos de fresa con aumentos de diámetro progresivos, o el uso de una única fresa.⁶⁸

ESTABILIDAD IMPLANTARIA

Definición. Estudios clásicos de traumatología demuestran que la reparación de una fractura ósea requiere de una estabilidad mecánica y un microambiente biológico favorable, para asegurar una cicatrización exitosa del tejido nativo⁶⁹, especialmente durante las primeras fases de la osteosíntesis⁷⁰. Del mismo modo, para conseguir y mantener la osteointegración de los implantes dentales también deben cumplirse ciertos requisitos biológicos y biomecánicos⁷¹. Entre los requisitos biológicos, destacan la presencia de un aporte vascular adecuado, así como la ausencia de bacterias que puedan desencadenar procesos infecciosos y poner en peligro el fenómeno de la neoformación ósea sobre la superficie del implante.^{69,70,72} En cuanto a los requisitos biomecánicos, destaca el control del micromovimiento, ya que se ha demostrado que en los implantes que superan cierto umbral de micromovimiento, cabe esperar un predominio de la encapsulación fibrosa en detrimento de la osteointegración. Según los diferentes trabajos publicados al respecto, este umbral estaría situado en torno a las 150 micras.⁶⁵ Esto se debe a que el micromovimiento induce la reabsorción de hueso de la interfase, destruyendo las células óseas y creando un gap que puede provocar el fracaso del implante.⁷³ Por lo tanto, desde un punto de vista clínico, el control de la estabilidad implantaria se considera un factor clave para la consecución y mantenimiento de la osteointegración de los implantes.

La estabilidad implantaria, puede definirse entonces como la ausencia de movilidad clínica del implante bajo una carga determinada y está influida por la densidad ósea, el diseño del implante y la técnica quirúrgica empleada.⁷⁴

Tipos de estabilidad implantaria. Inicialmente dicha estabilidad implantaria está proporcionada mecánicamente por las macrorretenciones derivadas de la geometría del implante que engrana en las paredes del lecho implantario. Esto se denomina estabilidad primaria, y es un tipo de estabilidad estática, que tiene lugar en un momento puntual del tiempo, justo en el momento de la colocación del implante en el hueso. Sin embargo, durante el proceso de osteointegración, esta estabilidad primaria o mecánica será reemplazada progresivamente por una estabilidad secundaria o biológica, como resultado de los procesos fisiológicos de remodelación y aposición ósea sobre la superficie del implante. La estabilidad secundaria es una estabilidad dinámica, ya que puede ir variando a lo largo del tiempo, tanto en aumento como en descenso.⁶ Tanto en una como en otra influyen variados y diferentes factores

Factores que influyen en la estabilidad implantaria

La estabilidad implantaria está condicionada por una gran variedad de factores, que pueden agruparse en tres categorías diferentes.

Factores dependientes del hueso

Densidad ósea. Son muchos los estudios publicados acerca de la influencia de la densidad ósea en la estabilidad primaria del implante, y la evidencia científica es muy contundente al respecto: la densidad ósea guarda una relación directa con la estabilidad implantaria, de manera que cuanto mayor sea la densidad del hueso receptor, cabe esperar que mayor será la estabilidad primaria del implante.⁷⁵⁻⁸⁰

Calidad ósea. La literatura científica respalda con evidencia una fuerte relación entre la estabilidad implantaria y la calidad del hueso circundante según la clasificación de Leckholm y Zarb,⁹ de manera que está demostrado que los implantes colocados en huesos tipo I o II obtienen una mayor estabilidad que aquellos colocados en huesos tipo III o IV.⁸¹⁻⁸⁶ Sin embargo, este argumento no hace si no corroborar la relación mencionada en el anterior apartado, entre la

estabilidad y la densidad ósea, ya que dicha clasificación de la calidad ósea está basada principalmente, en la densidad.

Presencia de hueso cortical. La presencia de hueso cortical es otro de los factores óseos que condicionan la estabilidad implantaria. Diversos estudios publicados demuestran que los implantes anclados en una o varias corticales obtienen valores de estabilidad superiores a los conseguidos por implantes colocados exclusivamente en hueso esponjoso.⁸⁷⁻⁸⁹ Entre estos estudios se encuentra el publicado recientemente por el autor de esta tesis, en el que se demuestra de manera clara la influencia de este factor.⁹⁰ Sin embargo, al igual que en el apartado anterior, este parámetro se encuentra íntimamente ligado a la densidad, ya que cabe pensar que el anclaje cortical proporciona al implante una estabilidad mayor debido a su mayor densidad respecto al hueso trabecular.

Factores dependientes del operador

Secuencia de fresado. La secuencia de fresado empleada es un factor determinante para la estabilidad del implante, especialmente para la estabilidad primaria. Generalmente cada fabricante de implantes proporciona al clínico una guía de secuencia de fresas que debe emplear para la colocación del implante, secuencia que varía en función del tipo de hueso donde este va a ser colocado. Sin embargo, el operador puede seguir al pie de la letra esta secuencia, o por el contrario, puede realizar modificaciones en el protocolo de fresado, en función de la estabilidad que espera obtener debido a otros factores determinantes, fundamentalmente la densidad ósea. Por ejemplo, si se va a colocar un implante en un hueso muy trabecular, con poca densidad, el clínico ya debe prever que la estabilidad primaria del implante será baja, por lo que puede optar por no utilizar la última fresa de la secuencia, con el objetivo de que el implante entre en el lecho óseo con una mayor fricción, y por lo tanto, obtenga una mayor estabilidad. Por el contrario, si se percibe que el lecho receptor está rodeado por un hueso de alta densidad, el operador deberá emplear herramientas adicionales a la secuencia de fresado convencional, tales como la fresa de perfil o el macho de terraja. La bibliografía es clara al respecto, y está demostrado que la técnica de infrafresado en anchura provoca un aumento de la estabilidad implantaria, especialmente cuando el implante es colocado en huesos de baja densidad.⁹¹⁻⁹³

En relación con la técnica de fresado, el autor de esta tesis junto a su grupo de investigación, publicó un estudio in vitro realizado en modelo animal ex vivo, en el que se analizó el efecto que produce el sobrefresado en altura en la estabilidad de los implantes. Los resultados de este estudio fueron muy concluyentes, ya que se observó que el sobrefresado vertical influía significativamente en los valores de torque de inserción del implante, pero no afectaba a su cociente de estabilidad implantaria (ISQ).⁹⁴

Utilización de osteotomos o compactadores. Para estos casos de hueso de baja densidad, también se ha indicado el uso de osteotomos para la preparación del lecho implantario. Algunos autores han demostrado que existe una correlación positiva entre el uso de osteotomos y la estabilidad primaria conseguida.^{93,94,95} Esto puede ser debido a cambios producidos en la micro-morfología del hueso trabecular peri-implantario causados por la condensación apico-lateral producida por los osteotomos. Por lo tanto, en estos casos, se consigue un aumento de la estabilidad primaria del implante debido a un incremento en la densidad del lecho óseo peri-implantario. Si bien es cierto, que otros autores, como Sadeghi y cols.⁹⁷ no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la estabilidad primaria de los implantes utilizando osteotomos o empleando la técnica de fresado convencional. Esto pudo ser debido a que todos los implantes colocados en el estudio consiguieron una alta estabilidad primaria, mientras que cuando realmente se nota el efecto de los osteotomos es en aquellos casos en los que los valores de estabilidad son bajos debido a la densidad.

Cirugía sin colgajo. En los últimos años también se ha postulado la posibilidad de llevar a cabo cirugías implantológicas sin necesidad de levantamiento de colgajo. Este tipo de abordaje ahorra tiempo de intervención, de cicatrización y mejora el post-operatorio del paciente. Existe cierta evidencia científica de que la colocación de implantes sin levantar colgajo mejora la estabilidad primaria y/o secundaria de los mismos.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Esto se podría explicar porque el hecho de levantar un colgajo podría tener cierto impacto en la remodelación ósea peri-implantaria. Cuando no se levanta un colgajo, el periostio permanece intacto recubriendo el hueso y esto incrementa el aporte vascular a la mucosa peri-implantaria, que además presenta menores signos de inflamación.¹⁰¹

Factores dependientes del implante

Diseño del implante. El diseño del implante es un factor clave que va a influir de manera determinante en la estabilidad mecánica, pero también en la estabilidad biológica. En los inicios de la implantología oral, la mayoría de los implantes eran cilíndricos, o también llamados “de paredes paralelas”. Sin embargo, los años y la investigación, han hecho que la tendencia del mercado de implantes haya ido evolucionando hacia un predominio de los modelos de implantes con diseños más cónicos, cuyas paredes convergen apicalmente. Esto ha sido debido a que muchos estudios han demostrado que los implantes cónicos, proporcionan una mayor estabilidad primaria que los implantes cilíndricos.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Tamaño del implante. El efecto que provoca el tamaño del implante en su estabilidad primaria, es un tema controvertido. Ostman y cols.¹⁰⁵ y Miyamoto y cols.¹⁰⁶ afirman que la estabilidad implantaria es mayor cuanto mayor es el diámetro del implante, pero menor cuanto mayor es su longitud. Esto debe su explicación a que algunos diseños de implantes largos tienen un diámetro menor en la parte coronal, para minimizar la fricción y facilitar su inserción.¹⁰⁷ Otros autores no encontraron ningún tipo de influencia del tamaño del implante en su estabilidad,¹⁰⁸⁻¹¹⁰ y otros, sin embargo, sí que obtuvieron valores de estabilidad más altos a medida que se incrementaba el diámetro del implante.^{111,112} Por lo tanto, no existe consenso en la literatura científica sobre el efecto que puede ejercer el tamaño del implante, tanto en diámetro como en longitud, en la estabilidad del mismo, por lo que se deduce que la estabilidad está más condicionada por otros factores, ya sean extrínsecos o intrínsecos al propio implante.

Tipo de superficie. La bibliografía demuestra que los implantes rugosos, es decir, con tratamiento de superficie a base de grabado ácido y/o chorreado de arena, obtienen valores más altos de torque de inserción que los implantes mecanizados de superficie lisa. Esto es debido a que la rugosidad del implante provoca un incremento en el coeficiente de rozamiento del mismo, aumentando la resistencia del hueso a su inserción.^{113,114} Sin embargo, el tratamiento de superficie parece no tener ninguna influencia sobre los valores de estabilidad primaria obtenidos mediante RFA.

En los últimos años, se han venido desarrollando las denominadas superficies de última generación o bioactivas. Este apelativo hace referencia a aquellos tipos de implantes que cuentan en su superficie con algún compuesto o sustancia que busca acelerar la osteointegración. Algunos ejemplos de estas superficies bioactivas pueden ser la superficie SLA Active de la casa comercial Straumann, ContacTi de klockner, o UnicCa de BTI. La evidencia científica demuestra que este tipo de superficies no tienen ninguna influencia en la estabilidad primaria de los implantes, pero sí en su estabilidad secundaria. Algunos estudios demuestran que ciertas superficies bioactivas, no consiguen valores de estabilidad mayores a largo plazo, pero sí que alcanzan valores de estabilidad altos en un tiempo menor, consiguiendo así su propósito de acelerar la osteointegración.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Medición de la estabilidad implantaria

Actualmente, la disminución de los tiempos de espera para la osteointegración gracias a las nuevas superficies modificadas más osteofílicas, con protocolos de carga temprana o inmediata, la tendencia a la cirugía en una fase, la aplicación de técnicas de regeneración para la obtención de soporte en anchura o altura, han convertido a la implantología en una técnica más eficaz y eficiente en la consecución de sus objetivos. Pero se ha complicado sustancialmente la toma de decisiones, especialmente en lo referente a la estabilidad implantaria, cuando se comparan con los protocolos originales, en los que se imponían cirugías en dos fases, tiempos de espera para la integración de 6 meses y carga después de ese periodo.

Es necesario entonces disponer de un sistema de medición de la estabilidad, y por ende de los micromovimientos, que guíe la toma de decisiones clínicas con respecto a las fases en las que programar la cirugía y los tiempos de carga.

A lo largo de los años, se han ido proponiendo diversos métodos invasivos y no invasivos para la medición de la estabilidad implantaria, la mayoría de ellos con limitaciones respecto a su fiabilidad, utilidad o especificidad.

- **Métodos invasivos.** Los métodos invasivos son aquellos que requieren la retirada del implante, perdiendo su unión al hueso del paciente. Por este motivo, estos métodos son de gran utilidad para la investigación y la experimentación, tanto in vitro como in vivo en modelo animal, pero no sirven para ser utilizados clínicamente. Entre ellos está el estudio histológico y el torque de desinserción.

El análisis histológico puede ser de gran utilidad para conocer el porcentaje de contacto entre el hueso y la superficie del implante (conocido como B.I.C. por sus siglas en inglés). A día de hoy, esta es la manera más precisa de analizar el grado de osteointegración de un implante, ya que expresa la cantidad relativa de hueso que se encuentra adherida sobre la superficie del implante. Por este motivo, algunos autores defienden que la estabilidad de un implante también puede conocerse de manera empírica a través su B.I.C., ya que cuanto mayor sea su osteointegración, mayor será su estabilidad.¹¹⁷ Sin embargo, esto no es así, ya que el B.I.C. y la estabilidad son parámetros diferentes, y no siempre tienen por qué ir de la mano, como veremos más adelante en el apartado de discusión.

El torque de desinserción expresa la fuerza necesaria para retirar un implante de su lecho óseo, y utiliza el Newton/cm² como unidad de magnitud. Es un método utilizado a veces en estudios de experimentación, pero nunca clínicamente, puesto que retirar un implante ya colocado, para medir la estabilidad que tenía, carecería de todo sentido.¹¹⁷

- **Métodos no invasivos.** Los métodos no invasivos son aquellos que no requieren la retirada del implante, y entre ellos se encuentra el test de percusión, el estudio radiográfico, el periotest, el torque de inserción y análisis de frecuencia de resonancia (AFR)

El test de percusión es el método que más se ha utilizado clínicamente a lo largo de los años para conocer si un implante está estable o no. Consiste en percutir con el mango del espejo de exploración, o con algún otro instrumento metálico romo, sobre la superficie del pilar de cicatrización, y en función del sonido que emita, determinar si la estabilidad es buena o mala.

Es evidente que es un método muy subjetivo, ya que depende de la percepción acústica de cada sujeto, lo que le convierte en un método muy poco fiable para la medición de la estabilidad. Sin embargo, no es menos cierto que dicho método posee una base científica, puesto que ya ha sido descrita en la literatura la determinación de la estabilidad implantaria mediante el análisis de armónicos.¹¹⁸ Sin embargo, para poder desarrollar dicha metodología y obtener una medición objetiva de la estabilidad usando este método, se hace necesaria la utilización de un captador de sonido o micrófono y un osciloscopio, así como un software informático específico que determine la frecuencia del sonido emitido al percutir sobre el implante. Por lo que el método clásico de golpear el implante con el espejo e interpretar el sonido de manera subjetiva carece de toda fiabilidad y objetividad.

En cuanto al estudio radiográfica, algunos artículos científicos relatan la posibilidad de predecir la estabilidad que va a obtener un implante antes del momento de su colocación, basándose para ello en las unidades Hounsfield de densidad ósea obtenidas al analizar mediante radiología 3D la zona de hueso receptora.^{79,119,120} Este sistema de medición se basa realmente en la densidad ósea del hueso donde va a ir colocado el implante, pero es un método que genera gran controversia, ya que como se ha mencionado anteriormente, son muchos, además de la densidad ósea, los factores que influyen en la estabilidad del implante. Por este motivo, puede darse el caso de un implante que haya sido colocado en un hueso de muy alta densidad, pero que, debido a una técnica quirúrgica deficiente, haya obtenido un bajo grado de estabilidad. Por lo tanto, no parece ser un método muy fiable, más allá de aportar al clínico una información preoperatoria muy valiosa, que le ayudará a planificar correctamente el acto de la colocación del implante.

El Periotest es un dispositivo electrónico desarrollado por Schulte^{121,122} en el año 1992, con el objetivo de poder cuantificar de manera objetiva la movilidad de los dientes. La técnica consiste en una pieza de mano que realiza una percusión electrónicamente controlada y reproducible sobre el diente. Al pulsar el botón, de la punta del dispositivo emerge un punzón que realiza 16 impactos sobre la superficie del diente, a razón de 4 por segundo a una velocidad de 2 m/s. El diente produce una desaceleración del impacto que es analizada y valorada en la unidad de registro. El tiempo de contacto entre el diente y la punta

percusora es de milisegundos lo que no causa cambios intersticiales ni en los fluidos del periodonto, a diferencia de lo que ocurre con los métodos estáticos. En función del tiempo de contacto con el diente, el dispositivo establece una escala numérica de valores objetivos, denominados “Valor Periotest” (VPT). Estos valores pueden oscilar entre -8 y +50. El valor periotest (VPT) es un parámetro biofísico influenciado por las características del periodonto, todas las alteraciones en el hueso y tejido blando producen un tiempo de contacto diferente para fracciones de milisegundos.

De todos los métodos no invasivos, el más empleado es el torque de inserción. Un torque de inserción elevado se ha considerado como indicativo de un implante bien fijado y estable en el lecho óseo^{9,10}, aunque realmente lo que expresa es la resistencia antirrotacional y se debe a la compresión del cuello del implante en el hueso cortical crestal, el apoyo del implante en la base del lecho óseo preparado y al cerclaje derivado del macrodiseño del implante¹¹. El torque de inserción puede medirse con un torquímetro, con una llave dinamométrica, e incluso con algunos motores de colocación de implantes, que traen un torquímetro incorporado. Su unidad de medición es el Newton/cm² (N/cm²), aunque a menudo se hace referencia a ella como simplemente “Newton” (N).

La principal limitación asociada a este método es que solo es aconsejable emplearlo durante la inserción del implante, puesto que usado en otros momentos de la cicatrización o de la carga del implante, como el torque reverso o de desatornillado, propuesto por Sullivan¹⁴ y cols. en 1996, puede provocar una afectación de la estabilidad o incluso dañar la interfase hueso implante. Hay publicados muchos trabajos en los que se ha encontrado una correlación estadística entre el torque de inserción y otros métodos empleados para determinar la estabilidad, tales como el análisis de frecuencia de resonancia (valores ISQ)^{11,12,13} y la medición de la oscilación horizontal (valores PTV)¹³. La principal limitación asociada a este método es que solo es aconsejable emplearlo durante la inserción del implante, puesto que usado en otros momentos de la cicatrización o de la carga del implante, como el torque reverso o de desatornillado, propuesto por Sullivan¹⁴ y cols. en 1996¹⁴, puede provocar una afectación de la estabilidad o incluso dañar la interfase hueso implante.

El análisis de frecuencia de resonancia proporciona mediciones objetivas de la estabilidad implantaria sin dañar la unión implante-tejido¹⁵ y es más sensible que otros métodos diagnósticos anteriormente apuntados. Consiste en un dispositivo que funciona emitiendo un impulso magnético que ejerce una fuerza de flexión controlada sobre un transductor previamente atornillado al implante y cuantifica la frecuencia de resonancia característica del implante dentro de su hueso de soporte. Los primeros sistemas de AFR, fabricados por Ostell® (Osstell AB, Goteborg, Suecia), expresaban la frecuencia de resonancia del implante en hercios. Esto suponía cierta complejidad para el clínico a la hora de establecer una correlación con la estabilidad del implante, por lo que, en las posteriores generaciones, el fabricante inventó una nueva unidad de conversión que simplificaba enormemente el procedimiento clínico de medición de la estabilidad. El dispositivo incluye una pantalla donde se indica la frecuencia recogida en valores ISQ (Implant Stability Quotient), que oscilan en un rango de 1 a 99, siendo 1 el menor valor de estabilidad posible y 100 el máximo.⁷⁴ El AFR proporciona información objetiva acerca de la rigidez de la unión hueso-implante^{74,123} y del desplazamiento lateral del implante ante la aplicación de carga.¹²⁴ Al mismo tiempo, ha demostrado ser un método repetible y reproducible para la medición de la estabilidad implantaria,¹²⁵ además de ser el único sistema capaz de determinar el micromovimiento de un implante, que como ya se ha mencionado anteriormente, es un parámetro de vital importancia para la consecución de la osteointegración.¹²⁶ Pero sin duda, una de las grandes ventajas de este sistema es que permite realizar una monitorización del proceso de osteointegración de un implante, ya que es capaz de medir no sólo la estabilidad primaria, en el momento de la colocación del implante, si no también la estabilidad secundaria, en cualquier momento de la vida funcional del implante. Esto, unido a que se trata de un método no invasivo, repetible y reproducible, y que es capaz de determinar el micromovimiento implantario, lo convierten, sin duda alguna, en la mejor herramienta disponible hoy en día para la medición de la estabilidad implantaria.

DISPOSICIÓN DE LAS TRABÉCULAS ALREDEDOR DE LOS IMPLANTES

En los últimos años se ha escrito e investigado mucho sobre la supervivencia y éxito de los implantes dentales, habiéndose publicado una

ingente cantidad de artículos científicos sobre multitud de temas relacionados con dichas cuestiones. Sin embargo, poco se sabe acerca de la disposición y estructuración del tejido óseo periimplantario durante la osteointegración, y menos aún sobre las posibles variaciones que pueda sufrir tras la aplicación de carga funcional. Está más que demostrado que el titanio de los implantes es capaz de integrarse en la estructura ósea del ser humano (o de cualquier otro animal) mediante la aposición de hueso neoformado sobre la superficie del implante, y la mayoría de los estudios científicos se centran en estudiar el BIC como parámetro clave en la cuantificación de la osteointegración. Por el contrario, la supervivencia a largo plazo de los implantes osteointegrados depende más de la capacidad del hueso para funcionar eficazmente bajo las cargas oclusales que de la cantidad de tejido periimplantario; por lo que las propiedades mecánicas del hueso y su disposición espacial se consideran factores muy importantes.¹²⁷ Además, los procesos de reparación y remodelación que ocurren en el hueso cerca de un implante dental cargado también son importantes para una organización estable de la matriz ósea, con el fin de alcanzar un alto nivel de resistencia a la tensión. La cicatrización ósea es un proceso único e indivisible que se caracteriza por cuatro fases a nivel tisular: las fases de callo, remodelación y modelado, acompañadas de un fenómeno de aceleración regional (RAP). La osteotomía para la colocación de implantes produce un RAP que existe durante todo el proceso de cicatrización y acelera la angiogénesis, la formación de callos y las fases de remodelado y modelado. Inicialmente se forma un callo de fractura suave con una neoangiogénesis conspicua, células de apoyo y precursoras.¹²⁸ Los osteoblastos que producen el hueso fibroso llenan los espacios entre la superficie del implante y el hueso pristino. Después de que el callo se mineralice, la unidad multicelular básica remodeladora (UMB) comienza a reemplazarla con paquetes de hueso laminar nuevo, generalmente en relación con la dirección de la deformación. El modelado modifica la forma y el tamaño del callo para hacerlo fuerte. Alguna evidencia indica que las pequeñas deformaciones ayudan a guiar el proceso de remodelación y modelado en la cicatrización ósea,¹²⁹⁻¹³¹ mientras que, sin ninguna deformación, la remodelación en modo desuso tiende a eliminar el callo y la curación se puede retrasar.

Sin embargo, todavía hoy se desconoce si este proceso de aposición ósea sobre la superficie del implante se produce de una forma aleatoria y amorfa,

o si, por el contrario, sigue algún tipo de patrón estructural y/o organizativo. ¿Las trabéculas óseas alrededor de los implantes se disponen tridimensionalmente de la misma manera que cuando forman un callo óseo para reparar una fractura? ¿Siguen la misma organización cuando los implantes están sometidos a carga y cuando no lo están? ¿La carga inmediata hace que la disposición alrededor del implante de dichas trabéculas sea diferente que en aquellos que han seguido un protocolo de carga diferida?

En este sentido, el grupo de trabajo del Dr. Adriano Piatelli,¹³²⁻¹³⁵ realizó una serie de investigaciones durante los años comprendidos entre 2005 y 2008, que fueron publicando en varios artículos con alto factor de impacto. En todos ellos, estudiaron la disposición y orientación de las fibras de colágeno alrededor de los implantes dentales durante la osteointegración, comparando aquellos que habían recibido carga inmediata y los que, por el contrario, habían permanecido sumergidos y libres de carga. El hecho de estudiar la disposición de las fibras de colágeno se debe a que estas fibras, que posteriormente pasarán por un proceso de calcificación para convertirse en hueso, son las precursoras de las trabéculas óseas que rodearán el implante. Las fibras de colágeno están implicadas en el inicio de la calcificación de la matriz ósea con muchas otras proteínas de la matriz que incluyen la condrocalcina, los proteoglicanos, la osteonectina y la osteocalcina.¹³⁶ La elasticidad del hueso y, por tanto, su resistencia a la fractura están relacionadas con la orientación de las fibras de colágeno, con el grado de mineralización y finalmente con el contenido de agua.

En el primer artículo, publicado por Traini y cols. en 2005,¹³² estudiaron la orientación de las fibras de colágeno alrededor de implantes de titanio colocados en humanos y sometidos a carga. Para llevar a cabo dicho estudio, los autores retiraron 20 implantes osteointegrados, colocados en 10 pacientes 6 meses antes, y mediante el uso de luz polarizada circular y con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido, estudiaron la birrefringencia del hueso, para comparar la orientación que presentaban las fibras de colágeno en el hueso periimplantario y en el hueso alveolar. Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la disposición de dichas fibras de colágeno. Mientras que en el hueso alveolar predominaron las fibras longitudinales, en el hueso periimplantario se observó un predominio claro de las fibras orientadas de

forma transversal al eje del implante. Además, se apreció como las fibras transversales estaban más presentes debajo de las primeras espiras de los implantes, donde la carga actúa con vectores de compresión, mientras en las zonas más alejadas de los implantes, donde la carga actúa como vector de tracción, predominaban las fibras con orientación longitudinal. Esto coincide con estudios previos realizados en especímenes femorales humanos, que han demostrado que las fibras de colágeno orientadas transversalmente son más frecuentes en las áreas óseas que están sometidas a compresión.^{137,138}

Ese mismo año, Traini y cols.¹³³ Publicaron otro artículo que seguía la misma línea que el anterior. En esta ocasión, los autores colocaron 10 implantes en la mandíbula edéntula de 10 pacientes, además de un implante adicional en la parte distal de cada mandíbula. A 5 pacientes se les aplicó un protocolo de carga inmediata, colocándose el mismo día de la cirugía una prótesis provisional fija atornillada sobre todos los implantes, mientras que los implantes de los otros 5 pacientes se dejaron sumergidos sin cargar. 6 meses después, se retiraron con una trefina los implantes adicionales, y se hicieron cortes para su análisis histológico. A continuación, mediante el uso de luz polarizada circular y con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido, estudiaron la birrefringencia del hueso, para analizar la orientación de las fibras de colágeno, tanto en los implantes que habían recibido carga, como en los que no. Los resultados demostraron de forma estadísticamente significativa, que en los implantes que habían recibido carga presentaban un predominio de fibras de colágeno transversales, mientras que en los implantes que habían permanecido sin carga durante el proceso de osteointegración, eran mucho más abundantes las fibras de colágeno orientadas en sentido longitudinal al eje del implante.

Al año siguiente, Neugebauer y cols.,¹³⁴ publicaron otro artículo perteneciente a la misma línea de investigación, en el que habían estudiado la organización del hueso alrededor de implantes dentales con carga inmediata, en comparación con la de aquellos que no habían recibido carga. En esta ocasión, el estudio fue realizado en un modelo animal, y para ello, colocaron un total de 85 implantes en la mandíbula de 7 minipigs. Algunos de esos implantes fueron sometidos a un protocolo de carga inmediata, mediante la confección de una prótesis de resina que ferulizaba varios de los implantes, mientras que el resto

se dejaron sumergidos y sin carga, lo que permitía que ejercieran las funciones de controles. 3 meses después, los animales fueron sacrificados, y todos los implantes fueron retirados para la realización del estudio histológico. La histomorfometría se realizó utilizando un microscopio óptico con luz polarizada transmitida, conectada a una cámara de video de alta resolución interconectada a un ordenador. Según los resultados publicados en el estudio, los implantes cargados inmediatamente mostraron un mayor grado de formación y remodelación ósea en comparación con los implantes que habían permanecido libres de carga. Al igual que en el estudio realizado en humanos y publicado un año antes, los implantes con carga inmediata también demostraron una mayor prevalencia de fibras de colágeno orientadas transversalmente en el hueso periimplantario, a diferencia de los implantes sin carga, alrededor de los cuales se observó una mayor cantidad de fibras orientadas en sentido longitudinal.

Por último, el trabajo de Traini y cols.¹³⁵ en 2009, completa la tetralogía de esta línea de investigación. En esta ocasión, los autores colocaron 25 implantes en 5 minipigs. A cada uno de los ejemplares le colocaron 5 implantes en un lado de la mandíbula, de tal forma que, 4 de ellos fueron cargados de manera inmediata con una restauración fija, mientras que el implante restante se dejó sumergido sin carga. 4 meses después, todos los implantes fueron retirados con una trefina, y se analizó el hueso periimplantario mediante una luz circular polarizada, y un microscopio electrónico de barrido. Los resultados demostraron que no había diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de contacto hueso-implante entre los implantes que habían recibido carga y los que no. Sin embargo, sí que las hubo en la orientación de las fibras de colágeno alrededor de los implantes, así como en el grado de mineralización del hueso periimplantario. Los implantes que habían seguido el protocolo de carga inmediata, mostraron una mayor cantidad de fibras de colágeno dispuestas con una orientación transversal, mientras el grado de mineralización del tejido óseo circundante también resultó ser significativamente superior. Los autores dejan la puerta abierta a futuras investigaciones para analizar de una forma más exhaustiva la relación entre la dirección de la carga recibida y la orientación de las fibras de colágeno.

Una vez revisada la literatura científica publicada hasta la actualidad sobre la distribución y orientación de las trabéculas óseas alrededor de los implantes dentales durante la osteointegración, así como sobre la evolución de la estabilidad implantaria en función del protocolo de rehabilitación protésica empleado, se observa que apenas existe bibliografía al respecto. Este ha sido el principal motivo para llevar a cabo este proyecto de tesis doctoral, que pueda dar respuesta a las cuestiones planteadas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

Del análisis y valoración crítica del estado actual del tema, surgen las siguientes hipótesis de trabajo o iniciales:

1. El estímulo biomecánico, transmitido al terreno de soporte en forma de carga funcional de deambulación aplicada sobre los implantes, produce un incremento de su estabilidad secundaria, en comparación con aquellos que no reciban dicho estímulo.

2. La puesta en función de los implantes por carga de deambulación desde el día de su colocación, acelera su proceso de osteointegración, comprobado en términos de contacto hueso-implante.

3. La aplicación de carga funcional deambulatoria sobre el hueso periimplantario provoca una reorganización del mismo, en busca de la disposición más eficiente desde el punto de vista biomecánico, que facilite la estabilización de los implantes y una distribución favorable de la carga sobre el terreno de soporte.

En cualquier caso, para una mejor comprensión es preferible formular objetivos generales y específicos.

Así el **Objetivo general** que se pretende alcanzar es:

Medir o especificar mediante variables histológicas e histomorfométricas el resultado de la puesta en función de implantes cargados de manera inmediata con carga funcional de deambulación, en un modelo experimental animal in vivo.

Y como **Objetivos Específicos**, entendidos como aquellos que finalmente se pretende conseguir se formulan los siguientes:

1. Mostrar la influencia de la carga funcional de deambulaci3n inmediata en la osteointegraci3n de los implantes dentales.
2. Medir y describir la evoluci3n que sufre la estabilidad biol3gica de los implantes dentales cuando el hueso de alrededor es sometido diariamente a un est3mulo biomec3nico.
3. Cuantificar y precisar el efecto que produce la carga funcional de deambulaci3n inmediata en las caracter3sticas histol3gicas del hueso periimplantario neoformado, as3 como en el porcentaje de contacto hueso-implante.
4. Establecer y constatar la influencia de la carga funcional de deambulaci3n inmediata en la formaci3n de hueso nuevo sobre la superficie de los implantes, as3 como el grado de maduraci3n de la matriz 3sea alrededor de los mismos.
5. Comparar los patrones que se producen en la disposici3n tridimensional del tejido 3seo periimplantario en funci3n del protocolo de carga funcional establecido.

4. MATERIAL Y METODOLOGÍA

Para la realización de este proyecto de tesis doctoral, se ha seguido la guía ARRIVE para la presentación de experimentos in vivo en investigación animal, con la intención de conseguir un estudio más reproducible y una adecuada comunicación de los hallazgos (ver Anexos).¹³⁹ Previo a la realización del proyecto, el autor del mismo obtuvo los certificados de capacitación para la experimentación animal, categorías A, B, C y D, lo que, desde un punto de vista legal, le permite realizar, diseñar y dirigir proyectos de investigación de experimentación con animales in vivo (Ver Anexos).

1. MUESTRA Y PROCEDER QUIRÚRGICO

La muestra fueron 10 conejos adultos de raza neozelandesa (*Oryctolagus cuniculus*), nacidos y criados en la Granja San Bernardo (Tulebras, Navarra, España). Todos los ejemplares eran de sexo masculino, 4 meses de edad, y un peso medio de 3,75 kg (3,52- 4,02 kg) (**Figura 2**). El estudio fue realizado con la aprobación del Comité de Bioética para la Investigación Animal de la Universidad de Oviedo, con el código de autorización 18/2019 (Oviedo, Asturias, Spain).

La muestra se dividió en dos grupos, el grupo test y el grupo control, que se especificará mas adelante. Puesto que todos los conejos deben ser sometidos a ejercicio físico antes de la intervención quirúrgica, necesitan un periodo de adaptación que se llevó a cabo de la siguiente manera:



FIGURA 2: *Fotografía de un conejo adulto de raza neozelandesa utilizado en el ensayo.*

FASE DE ADAPTACIÓN

Previamente a la cirugía los 10 animales pasaron por una fase de adaptación de dos semanas, cuyo objetivo fundamental fue que se acostumbraran a la cinta sobre la que iban a correr los 5 ejemplares que finalmente fueron asignados al grupo Test, durante la fase de osteointegración.¹³⁹ Para ello se utilizó una cinta de correr (MC100, Fitfiu Fitness, Valls, España) **(Figura 3)** especialmente adaptada para esta función mediante el acoplamiento de una jaula metálica abierta por arriba y por abajo para permitir que el conejo pudiera correr en la cinta sin escaparse. La primera semana los conejos permanecieron sobre la cinta de correr apagada, sin movimiento, durante 10 minutos al día. La segunda semana, los conejos permanecieron sobre la cinta de correr en movimiento, a la velocidad mínima (10m/s), durante 10 minutos con el objetivo de acostumbrarse paulatinamente a la cinta antes de la cirugía, y reducir así el estrés postoperatorio.



FIGURA 3: *Cinta de correr empleada para la realización del estudio.*

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Todos los conejos fueron operados bajo anestesia general, utilizando previamente una inyección intramuscular con una mezcla de dexmedetomidina (Dexdomitor; Ecuphar, Barcelona, España), ketamina (Ketamidor; Karizoo, Barcelona, España) y buprenorfina (Bupaq; Richter Farma, Wells, Austria) para la inducción. El mantenimiento de la anestesia fue realizado mediante inhalación de isoflurano (Isoflo, Zoetis, Madrid, España), a una concentración fijada en el vaporizador de 1-2%. Además, se inyectó anestesia local infiltrativa en la zona a intervenir utilizando para ello hidrocloreuro de articaína con epinefrina 40/0.01 mg/ml (Ultracain; Laboratorios Normon, Madrid, España).

Se rasuraron ambas patas posteriores de cada conejo, y se utilizó povidona yodada para desinfectar la piel (**Figura 4**).

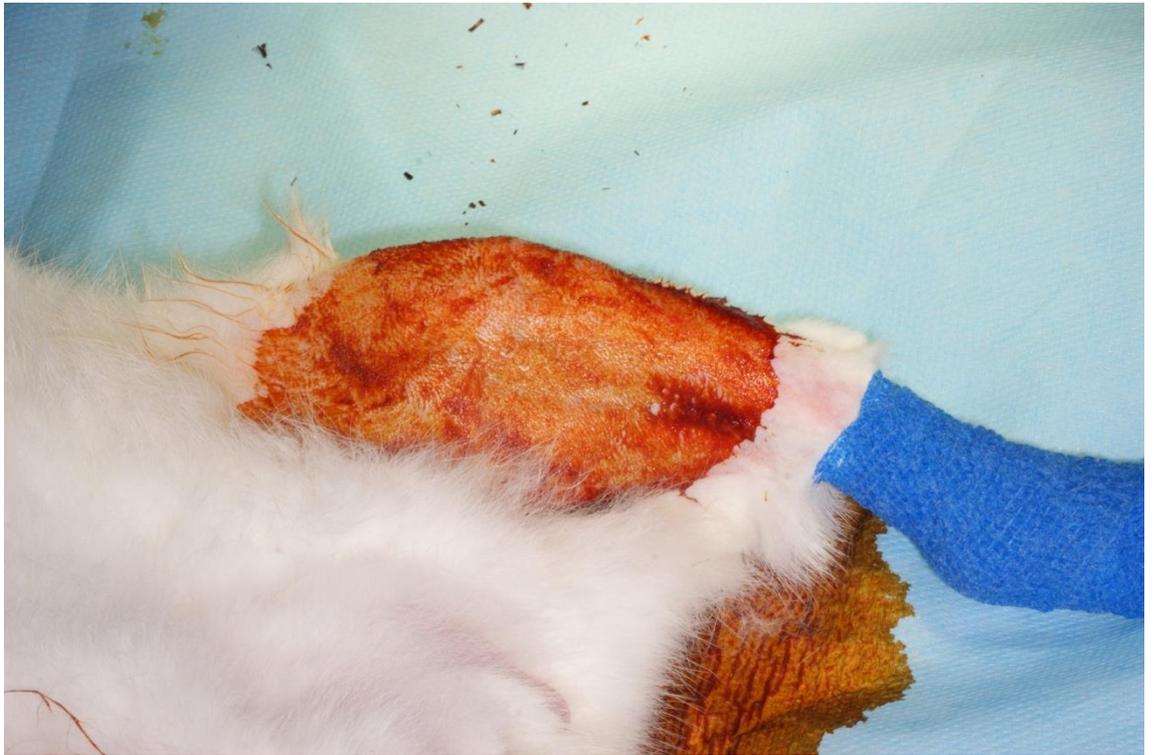


FIGURA 4. *Imagen de la preparación del campo quirúrgico de la zona a intervenir en la pata izquierda de uno de los conejos, adecuadamente rasurada y desinfectada con povidona yodada.*

Posteriormente se realizó una incisión única en la cara interna de cada tibia en todos los animales y se abrió un colgajo a espesor total (**Figura 5**)

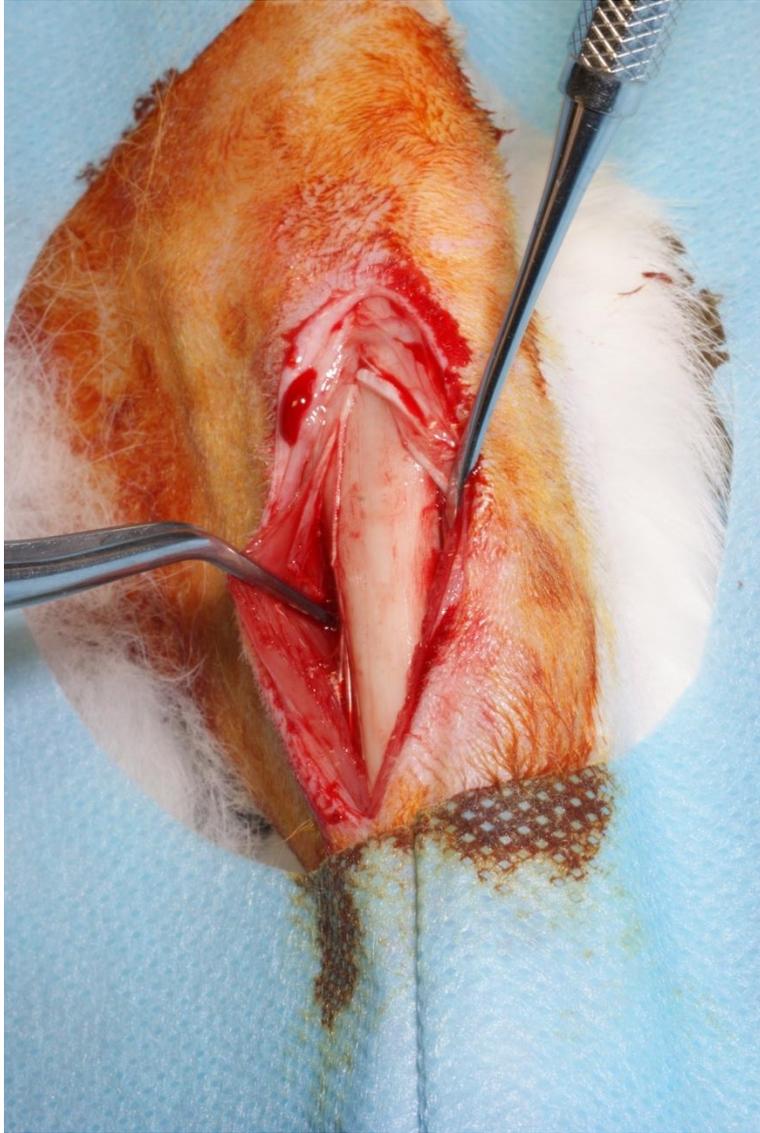


FIGURA 5: *Incisión mucoperióstica y apertura de colgajo a espesor total permitiendo el acceso a la tibia.*

A continuación, se colocaron dos implantes Klockner Vega 3.0x8mm (Soadco. Escaldes Gordany, Andorra) en la cara interna de cada tibia, en la zona más próxima a la epífisis, siguiendo el protocolo de fresado completo recomendado por el fabricante, con anclaje bicortical, y dejando una distancia de 6 mm entre ambos implantes. (**Figuras 6-10**). La muestra de implantes total resultó entonces de 40 (n=40).



FIGURA 6. *Comienzo de la preparación del lecho implantario marcando las posiciones de los implantes con fresa lanceolada.*

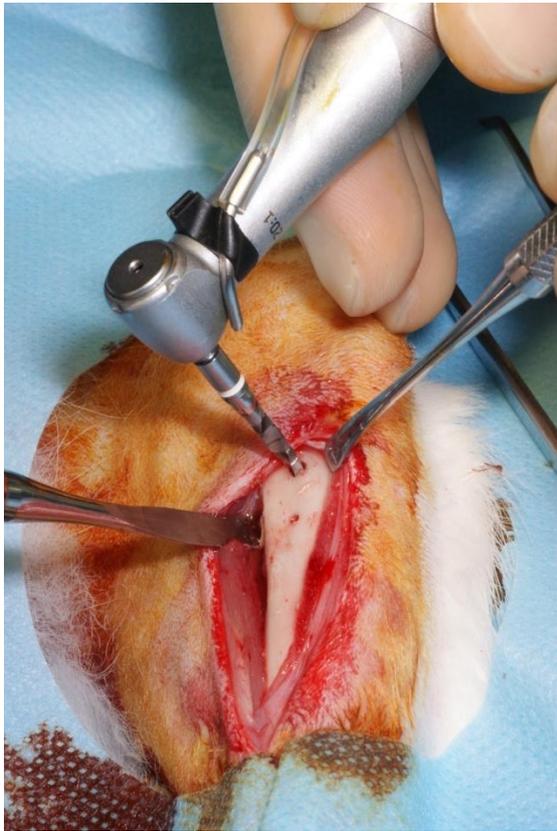


FIGURA 7. Utilización de fresa piloto de aro blanco de 1,8mm de diámetro.

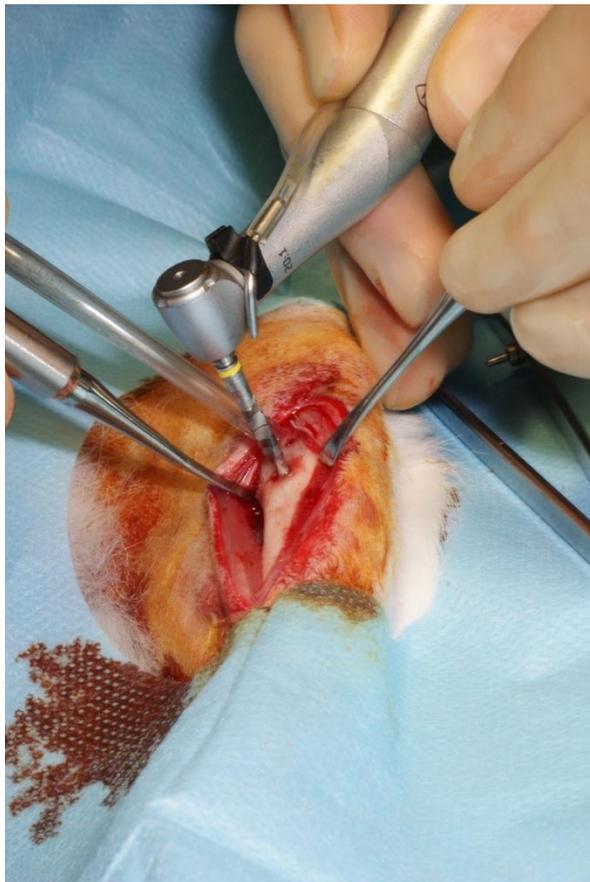


FIGURA 8. Utilización de fresa final de aro amarillo de 2,8mm de diámetro.

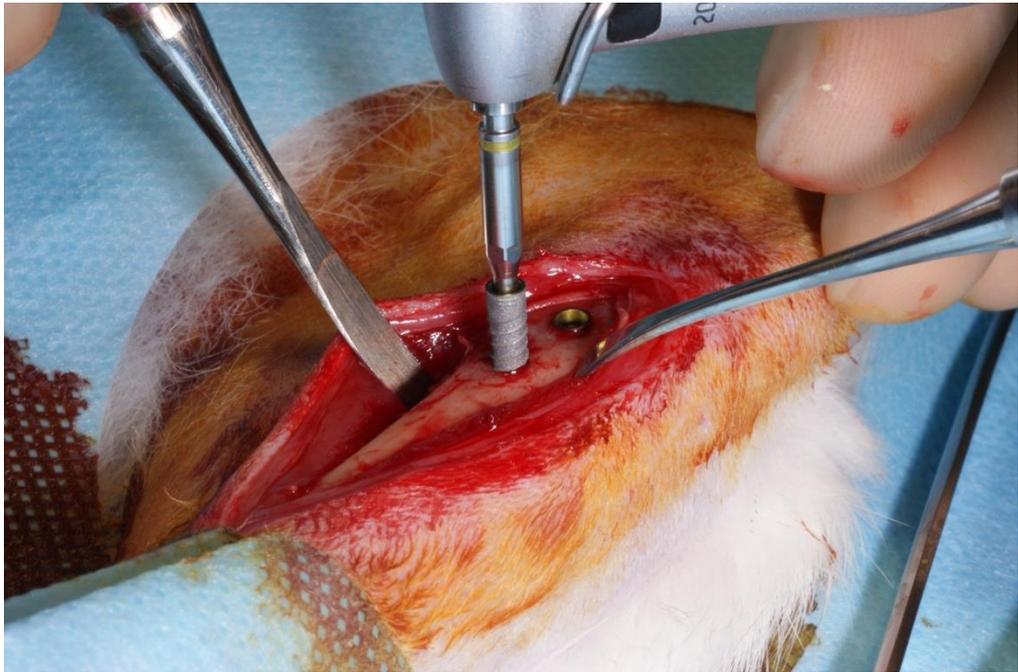


FIGURA 9. *Inserción con micromotor de los implantes klockner Vega 3.0x8mm.*

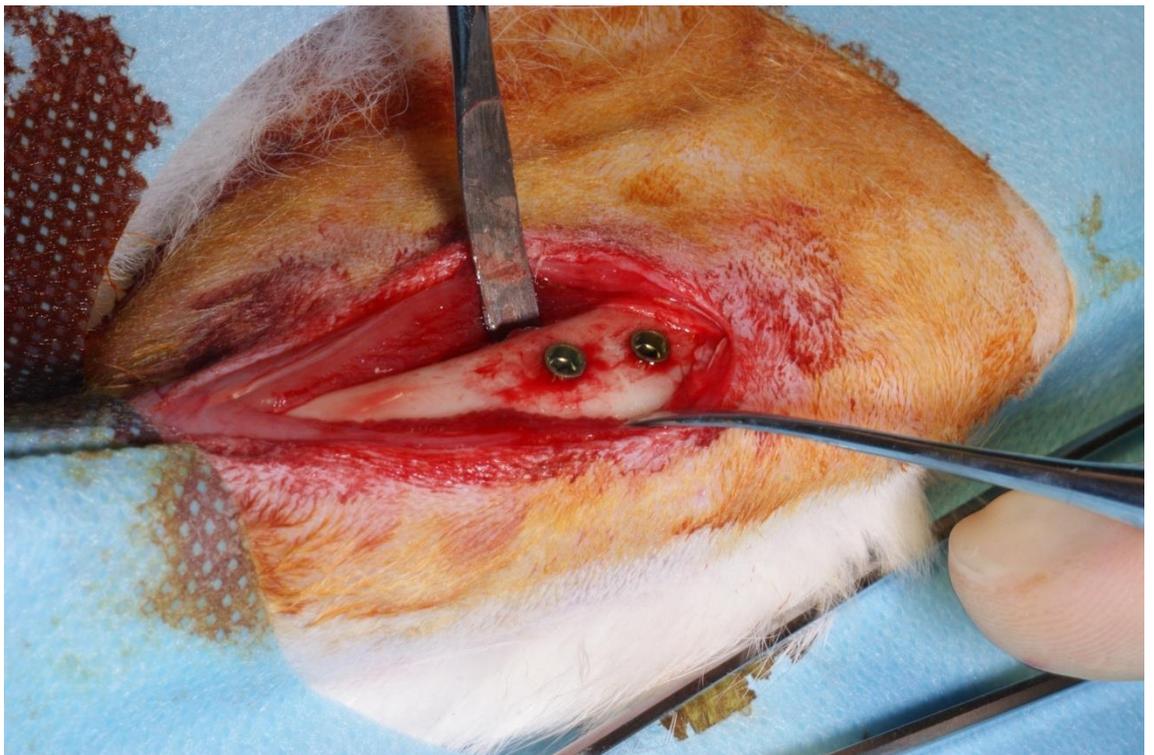


FIGURA 10. *Imagen de los dos implantes dentales colocados en su posición final en uno de los conejos.*

2. PROCEDIMIENTOS DE REGISTRO Y MEDIDA

Se confeccionó un protocolo ad hoc para registrar lo siguiente:

- MEDICIÓN DE LA ESTABILIDAD PRIMARIA

Una vez colocados los implantes, se midió la estabilidad primaria mediante los métodos de torque de inserción y de análisis de frecuencia de resonancia. El torque de inserción se registró en N/cm^2 , utilizando la llave dinamométrica propia del sistema quirúrgico de implantes Klockner (Soadco, Escaldes - Engordany, Andorra), y el análisis de frecuencia de resonancia, expresado en ISQ, se registró mediante un dispositivo Penguin RFA (Integration Diagnostics Sweden AB, Gothenburg, Suecia) y los postes de medición multipleg específicos para los implantes Klockner VEGA de diámetro 3mm. (**Figura. 11**).

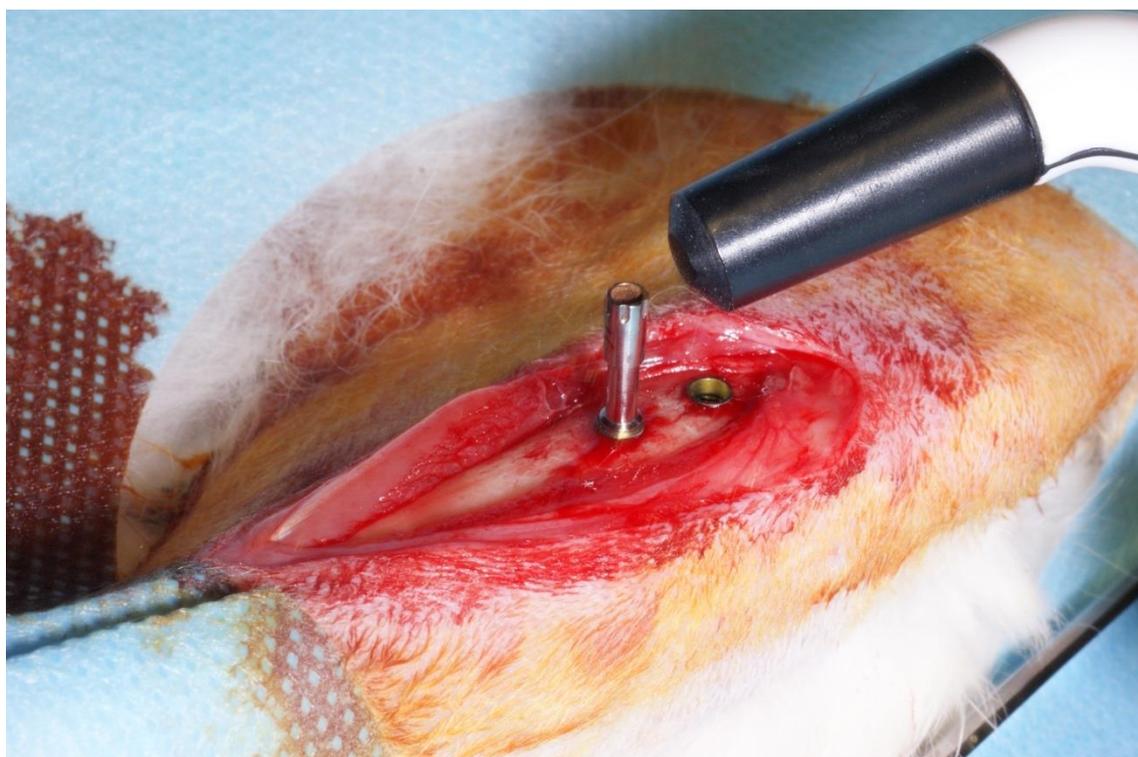


FIGURA 11. *Medición de la estabilidad primaria con un dispositivo de análisis de frecuencia de resonancia PenguinRFA.*

Una vez realizadas estas mediciones se colocó sobre los implantes unos pilares de cicatrización de 2mm de altura, con marcas realizadas con láser cada 0,5mm y fabricados específicamente para este estudio (Soadco, Escaldes Gordany, Andorra) (**Figura 12 y 13**). Esto permitirá cuantificar un posible

crecimiento óseo vertical durante la fase de osteointegración y comparar los resultados entre ambos grupos. Los pilares de cicatrización se dejaron sumergidos al realizar una sutura por planos con puntos simples mediante una sutura reabsorbible de 4/0 de ácido glicólico al 90% y ácido láctico al 10% marca Vicryl (Johnson & Johnson International; Somerville, Estados Unidos) y conseguir así un adecuado cierre primario de la herida. **(Figura.14)**.



FIGURA 12. *Imagen de uno de los pilares de cicatrización fabricados ad hoc para este estudio. Obsérvense las marcas realizadas con láser cada 0,5mm para poder cuantificar de manera objetiva el crecimiento óseo en sentido vertical.*

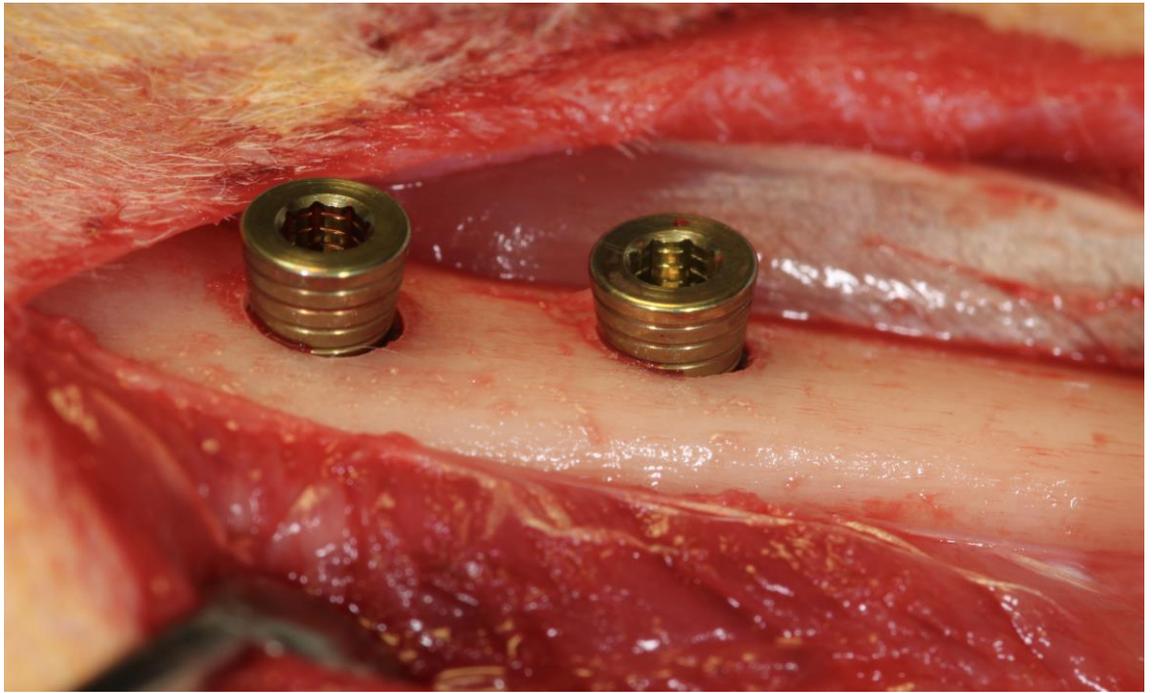


FIGURA 13. *Imagen de los pilares de cicatrización colocados sobre los implantes recién insertados en la tibia de uno de los conejos.*



FIGURA 14. *Cierre de la herida quirúrgica con sutura reabsorbible.*

Como se ha anteriormente, inmediatamente después de la cirugía se estableció dentro de la muestra de los 10 conejos, una asignación aleatorizada por bloques permutados (5 bloques de 2 elementos) al grupo Test (Grupo A) o y

otros tantos al Control (Grupo B). Esta asignación se realizó mediante la participación de un observador independiente, ajeno a los objetivos del estudio.

ESTIMULACIÓN BIOMECÁNICA

A partir del día siguiente a la cirugía, los 5 especímenes asignados al grupo test (grupo A) comenzaron a realizar ejercicio físico diario sobre la cinta de correr durante un período de 6 semanas, mientras se producía el proceso de osteointegración (**Figura.15**). Los primeros días el tiempo de carrera fue de 5 minutos, pero este se fue incrementando progresivamente hasta llegar a dos sesiones diarias de 10 minutos en las últimas 2 semanas. Los conejos realizaron este ejercicio físico de lunes a viernes, permitiéndoles descansar los fines de semana. Mientras tanto, los 5 animales del grupo control (grupo B) permanecieron en reposo en sus jaulas todo ese tiempo. Durante las 6 semanas, los animales de ambos grupos siguieron el protocolo de estabulación habitual, con alimentación *ad libitum*, y con ciclos de iluminación día/noche de 12h.



FIGURA 15. Imagen de uno de los conejos realizando ejercicio físico sobre la cinta de correr, mientras su cuidadora le observa con atención.

SACRIFICIO

Seis semanas después de la colocación de los implantes, los animales fueron sedados con dexmedetomidina (Dexdomitor; Ecuphar, Barcelona,

España) y diazepam (Valium, Roche Farma, Madrid, España). Posteriormente fueron sacrificados mediante inyección intravenosa de pentobarbital sódico con una sola dosis de 100 mg/kg.

A continuación, se abrió un colgajo de espesor total en cada tibia para la exposición de los implantes, y se tomaron fotos para analizar cuantitativamente el crecimiento óseo vertical que se había producido por encima de los implantes. Como el crecimiento óseo no fue homogéneo alrededor de cada implante, se tomaron dos mediciones: una en el punto de crecimiento mínimo y otra en el punto de crecimiento máximo. Después, se retiraron los pilares de cicatrización y se volvió a medir la estabilidad implantaria mediante Penguin RFA. Una vez hecho esto, se cortaron las tibias con una microsierra eléctrica y se obtuvieron bloques de hueso con los implantes incluidos para su estudio histológico. Para evitar la confusión entre el implante distal y proximal debido a la pérdida de referencias al cortar las tibias en bloques, al implante distal de todas las muestras se le quitó el pilar de cicatrización antes de enviarlas a la Universidad de Salamanca para su análisis histológico (**Figura 16**).



FIGURA 16. Imagen de uno de los bloques de hueso enviados para su análisis histológico e histomorfométrico. Puede observarse que al implante distal se le ha quitado el pilar de cicatrización para evitar confusiones durante su procesamiento.

PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron enviadas al Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, donde fueron deshidratadas mediante inmersión en etanol, y sin descalcificar fueron incluidas en metilmetacrilato líquido durante 15 días a 4°C en agitación. Después fueron mantenidas a 32°C durante 6 días. Una vez polimerizadas las muestras fueron cortadas con un micrótopo de baja velocidad mediante un disco de diamante (Isomet, Bueher® lake bluff, Dusseldorf, Alemania) de forma paralela al eje longitudinal del implante de titanio para obtener secciones centrales. A continuación, dichas secciones se tiñeron con la técnica histológica de Azul de Stevenel y picrofucsina de Van Gieson, en la que el hueso mineralizado aparece teñido de color rojo. La valoración histológica de las secciones obtenidas se llevó a cabo mediante un microscopio óptico (Nikon eclipse 90i, Nikon Corporation, Tokyo, Japón).

Análisis histomorfométrico

El análisis histomorfométrico se realizó mediante un observador independiente, ajeno a la asignación de caso/control y se utilizó para tal fin el programa MetaMorph Meta imaging Series 6.1 (Molecular Devices, California, Estados Unidos), analizando los siguientes parámetros:

- % BIC: Porcentaje de contacto hueso-implante en la región de interés (ROI). Se analizó exclusivamente el BIC en la zona coronal del implante, en el área que rodea al cuello del mismo. Se decidió no incluir la zona del anclaje apical, porque su relación con el implante era más heterogénea entre casos, puesto que era, a diferencia de la coronal, de imposible control durante la cirugía.

- Formación de nuevo hueso (mm²): cantidad de hueso neoformado sobre la superficie del implante.

- % de matriz ósea inmadura: proporción del área de hueso neoformado que se halla en estado de inmadurez, donde las fibras de colágeno se encuentran desorganizadas.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La descripción de las variables continuas se realizó mediante medidas de tendencia central y dispersión. Tras la comprobación de su normalidad por medio del test de Anderson y Darling, dada la falta de normalidad de las mismas, se comprobó la existencia o no de diferencias de significación estadística en las medianas de grupos por medio del test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Finalmente, la fuerza de la correlación lineal entre variables se midió con la ayuda del coeficiente de correlación de Pearson. Nivel de significación p igual o menor de 0,05

5. RESULTADOS

SUPERVIVENCIA DE LOS IMPLANTES

Todas las heridas quirúrgicas cicatrizaron correctamente, sin contratiempos, y todos los implantes se osteointegraron adecuadamente, lo que supone una tasa de supervivencia del 100% de los casos. Los resultados promedio obtenidos de las distintas variables analizadas pueden verse resumidos en la **Tabla 1**.

Variable	Grupo A (Test)	Grupo B (Control)	Valor de p
Crecimiento óseo vertical (mm.)	1.26 (0,47)	0,32 (0,46)	0,01
Bone to implant contact (%)	25,14 (5,24)	18,87 (4,45)	0.01
Área de hueso regenerado (mm ²)	280,50 (125,40)	228,00 (141,40)	0,121
Matriz ósea inmadura (%)	15,38 (8,84)	20,68 (9,53)	0,01

Tabla 1. Valores promedio, desviación estándar (entre paréntesis) y significación estadística de los resultados obtenidos de las diferentes variables analizadas en el estudio: crecimiento óseo vertical, porcentaje de contacto hueso-implante, área de hueso regenerado y porcentaje de matriz ósea inmadura.

CRECIMIENTO ÓSEO VERTICAL

En muchos de los implantes se apreció un crecimiento de hueso en sentido vertical, por encima de la plataforma del implante. Sin embargo, este crecimiento fue muy dispar en ambos grupos (**Figuras 17 y 18**). Además, el crecimiento óseo no resultó homogéneo en todo el perímetro del implante, por lo que se tomaron dos mediciones por implante: el punto de crecimiento máximo y el punto de crecimiento mínimo, y a continuación se calculó el valor promedio entre ambos extremos. Los resultados obtenidos pueden verse en la **Tabla 2**. En los implantes del grupo test (n=20) el crecimiento óseo vertical fue de $1,26\pm 0,48$ mm, mientras que en los implantes del grupo control (n=20) se apreció una ganancia ósea de $0,32\text{mm}\pm 0,47$ mm, lo que supone una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p<0,001$).



FIGURA 17. *Imagen de los pilares de cicatrización de un ejemplar del grupo control el día del sacrificio. Puede apreciarse que el crecimiento óseo que se ha producido por encima de la plataforma del implante es muy pequeño.*



FIGURA 18. *Imagen de los pilares de cicatrización de un ejemplar del grupo test el día de la eutanasia. Puede apreciarse el extraordinario crecimiento óseo vertical que se ha producido por encima de la plataforma del implante, cubriendo casi por completo ambos aditamentos.*

TEST	CREC. MÍNIMO	CREC. MÁXIMO	CONTROL	CREC. MÍNIMO	CREC. MÁXIMO
150IM	1	1,5	121IM	0	0
150ID	0,5	1,5	121ID	1	1,5
150DM	0,5	1	121DM	0	0
150DD	0	0,5	121DD	0,5	0,5
151IM	1,5	2	122IM	0	0,5
151ID	1	1,5	122ID	1	1
151DM	1,5	2,5	122DM	0,5	1
151DD	1	1	122DD	0	0,5
124IM	1,5	2	123IM	0,5	0,5
124ID	1	1	123ID	0	0
124DM	1	2	123DM	0,5	0,5
124DD	1	2	123DD	0	0
153IM	1,5	2	152IM	0	0
153ID	1,5	2	152ID	0	0
153DM	0,5	1	152DM	0	0
153DD	1	1,5	152DD	0	0
154IM	0,5	1,5	125IM	1	2
154ID	0,5	0,5	125ID	0	0
154DM	1	2	125DM	0	0
154DD	1,5	2	125DD	0	0
PROMEDIO	0,98	1,55	PROMEDIO	0,25	0,40
SD	0,44	0,56	SD	0,38	0,58

TABLA 2. Resultados en mm obtenidos en las mediciones de crecimiento óseo vertical sobre todos los implantes.

ESTABILIDAD IMPLANTARIA

En las **Tablas 3 y 4** pueden verse los resultados de estabilidad primaria obtenidos mediante el torque de inserción y el AFR el día de la colocación de los implantes, así como los valores ISQ de estabilidad secundaria el día del sacrificio, pasadas las 6 semanas de duración del estudio. Dado que el AFR debe medirse al menos en dos sentidos perpendiculares, las mediciones se tomaron en sentido vestíbulo-lingual y en sentido mesio-distal, y posteriormente se obtuvo el valor promedio entre ambas mediciones para facilitar el análisis estadístico de los resultados (**Tabla 5**).

TEST	TORQUE	ISQ VL INICIAL	ISQ MD INICIAL	ISQ VL FINAL	ISQ MD FINAL
150IM	35	74	74	89	76
150ID	35	65	74	90	86
150DM	<15	70	70	92	92
150DD	35	61	66	90	89
151IM	15	72	76	79	78
151ID	35	72	75	83	83
151DM	15	68	74	91	91
151DD	35	72	72	91	85
124IM	15	67	73	77	77
124ID	15	73	73	78	80
124DM	15	69	73	80	80
124DD	35	74	74	83	82
153IM	35	75	75	78	77
153ID	35	73	73	84	84
153DM	35	74	74	85	85
153DD	35	65	64	75	75
154IM	35	73	73	81	81
154ID	35	74	72	82	83
154DM	15	68	70	78	76
154DD	15	73	73	82	82
MEDIA	27,63	70,60	72,40	83,40	82,10
SD	9,91	3,83	2,95	5,38	4,95

Tabla 3. resultados obtenidos en los implantes test en las mediciones de torque de inserción, AFR en el momento de colocación del implante, y AFR en el momento de la eutanasia. apréciase que se tomaron dos mediciones de afr en cada momento, una en sentido vestíbulo-lingual (VL) y otra en sentido mesio-distal (MD).

CONTROL	TORQUE	ISQ VL INICIAL	ISQ MD INICIAL	ISQ VL FINAL	ISQ MD FINAL
121IM	35	77	77	83	83
121ID	35	65	74	81	81
121DM	15	64	73	81	81
121DD	35	67	67	83	83
122IM	35	72	71	73	74
122ID	35	69	68	77	77
122DM	15	70	76	82	76
122DD	15	67	74	85	77
123IM	15	72	76	81	81
123ID	15	74	74	79	80
123DM	15	74	74	74	74
123DD	35	71	78	76	84
152IM	15	76	77	73	73
152ID	15	77	77	83	83
152DM	15	76	76	73	76
152DD	15	64	64	83	83
125IM	35	72	72	73	73
125ID	35	76	76	76	76
125DM	15	71	71	76	76
125DD	15	76	76	75	75
MEDIA	23,00	71,50	73,55	78,35	78,30
SD	10,05	4,35	3,75	4,16	3,80

Tabla 4. Resultados obtenidos en los implantes control en las mediciones de torque de inserción, AFR en el momento de colocación del implante, y AFR en el momento de la eutanasia. Apréciese que se tomaron dos mediciones de AFR en cada momento, una en sentido vestíbulo-lingual (VL) y otra en sentido mesio-distal (MD).

Variable	Grupo A (Test)	Grupo B (Control)	Valor de p
Torque (N/cm)	27,00(10,05)	23 (10,05)	0,279
Estabilidad Primaria (ISQ)	71,50 (3,09)	72,53 (3,67)	0,262
Estabilidad Secundaria a las 6 semanas (ISQ)	82,75 (4,91)	78,33 (3,68)	0,008
Incremento promedio de ISQ	11,25 (6,10)	5,80 (5,97)	0,006

Tabla 5. *Media y desviación estándar (entre paréntesis) de los resultados obtenidos en las mediciones de torque de inserción, estabilidad primaria y estabilidad secundaria, así como el incremento producido en los valores ISQ durante el período de estudio.*

Los resultados muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de estabilidad primaria de ambos grupos; ni en torque de inserción (grupo A 27,00 N/cm \pm 10,13; grupo B 23,0 N/cm \pm 10,05; $p=0,279$), ni tampoco entre los valores ISQ iniciales (grupo A 71,50 ISQ \pm 3,09; grupo B 72,53 ISQ \pm 3,67; $p= 0,262$). Tampoco existe una correlación estadísticamente significativa entre los valores de torque de inserción y los valores ISQ iniciales (Coeficiente de Pearson=0,00). Como puede observarse, tanto en el grupo test como en el grupo control la estabilidad de los implantes aumentó de manera estadísticamente significativa durante el proceso de osteointegración, ya que los valores ISQ de todos los implantes fueron más altos en el momento del sacrificio que en el momento de su colocación (grupo A 82,75 ISQ \pm 4,91; grupo B 78,33 ISQ \pm 3,68; $p=0,008$). Sin embargo, este incremento fue superior de manera estadísticamente significativa en el grupo de los implantes test frente al grupo de los implantes control (Grupo A 11,25 ISQ \pm 6,10, 15,73%; Grupo B 5,80 \pm 5,97 ISQ, 7,99%; $p=0,006$).

CONTACTO HUESO-IMPLANTE

Los resultados de BIC obtenidos tanto en los implantes test como en los implantes control pueden verse recogidos en la **Tabla 6**. Los valores promedio de porcentaje de contacto hueso-implante fueron más altos en los implantes del grupo A (25,14%±5,24) que en los implantes del grupo B (18,87%±4,45), siendo estadísticamente significativas las diferencias entre ambos grupos ($p < 0.01$).

Por otro lado, tal y como recoge la **Tabla 1**, los resultados estadísticos permiten afirmar que existe una correlación directa entre los valores ISQ finales y los valores de BIC, aunque sin una asociación fuerte (Coeficiente de Pearson=0,528).

TEST	BIC	CONTROL	BIC
150IM	30,43	121IM	20,08
150ID	32,46	121ID	
150DM	21,81	121DM	30,50
150DD	36,07	121DD	25,60
151IM	25,15	122IM	17,46
151ID	28,78	122ID	
151DM	28,61	122DM	18,25
151DD	30,55	122DD	15,63
124IM	26,42	123IM	18,57
124ID	21,98	123ID	15,27
124DM	21,13	123DM	19,50
124DD	13,51	123DD	20,55
153IM		152IM	11,89
153ID	21,85	152ID	11,68
153DM	22,90	152DM	14,70
153DD	22,85	152DD	19,85
154IM	21,12	125IM	20,00
154ID	23,60	125ID	19,24
154DM	20,80	125DM	21,02
154DD	27,62	125DD	19,86
MEDIA	25,14	MEDIA	18,87
SD	5,24	SD	4,45

TABLA 6. Resultados del porcentaje de contacto hueso-implante de todos los implantes, tanto del grupo test, como del grupo control, así como la media y desviación estándar para cada uno de los grupos.

NEOFORMACIÓN ÓSEA

Las **Tablas 7 y 8** muestran los resultados obtenidos de la medición del área ocupada por hueso neoformado sobre la superficie de cada implante, así como el porcentaje de matriz ósea inmadura presente en cada uno de ellos.

TEST	AREA HUESO REGENERADO MM2	%MATRIZ ÓSEA INMADURA
150IM	375,55	16,47
150ID	462,71	8,45
150DM	126,36	6,51
150DD	260,42	
151IM	450,25	18,31
151ID	354,71	15,05
151DM	266,27	
151DD	124,55	14,99
124IM	290,08	17,43
124ID	460,6	12,43
124DM	372,55	21,14
124DD	248,04	39,72
153IM		
153ID	167,32	
153DM	244,33	19,38
153DD	112,31	
154IM	452,75	5,91
154ID	295,39	15,66
154DM	123,19	
154DD	142,96	3,81
MEDIA	280,54	15,38
SD	125,45	8,84

TABLA 7. Resultados del área de hueso regenerado y porcentaje de matriz ósea inmadura alrededor de los implantes del grupo test.

CONTROL	AREA HUESO REGENERADO MM2	% MATRIZ ÓSEA INMADURA
121IM	116,12	19,8
121ID	357,95	10,78
121DM	252,95	19,63
121DD	203,35	
122IM		
122ID		
122DM	221,46	14,67
122DD	278,08	16,57
123IM	53,96	13,93
123ID	96,51	30,04
123DM	113,58	16,82
123DD	281,52	48,05
152IM	148	
152ID	130,88	
152DM	207,61	29,74
152DD	112,76	
125IM	208,53	17,97
125ID	668,64	18,61
125DM	326,89	17,4
125DD	324,87	15,47
PROMEDIO	227,98	20,68
SD	141,41	9,53

TABLA 8. Resultados del área de hueso regenerado y porcentaje de matriz ósea inmadura alrededor de los implantes del grupo control.

El valor medio de área de neoformación ósea fue de $280,50 \text{ mm}^2 \pm 125,40$ en el grupo A y de $228,00 \text{ mm}^2 \pm 141,40$ en el grupo B. Aunque las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas ($p=0,121$), sí podemos afirmar que se observa una tendencia a formarse una mayor cantidad de hueso alrededor de los implantes del grupo test que en los del grupo control, mostrándose una correlación directa, aunque débil, entre la neoformación ósea y el BIC (Coeficiente de Pearson= $0,320$). Al mismo tiempo, el porcentaje de matriz ósea inmadura fue significativamente inferior en el grupo A ($15,38\% \pm 8,84$) que en el grupo B ($20,68 \pm 9,53$) ($p=0,108$), mostrando una correlación estadística inversa con el BIC (Coeficiente de Pearson= $-0,498$). Estos datos se corresponden con un menor número de fibras colágenas inmaduras en los

implantes que recibieron carga, lo que demuestra una maduración ósea más rápida alrededor de los implantes del grupo test que alrededor de los implantes del grupo control. Los resultados de las variables de estabilidad e histomorfométricas analizados anteriormente, quedan reflejados de manera gráfica en la **Figura 19**.

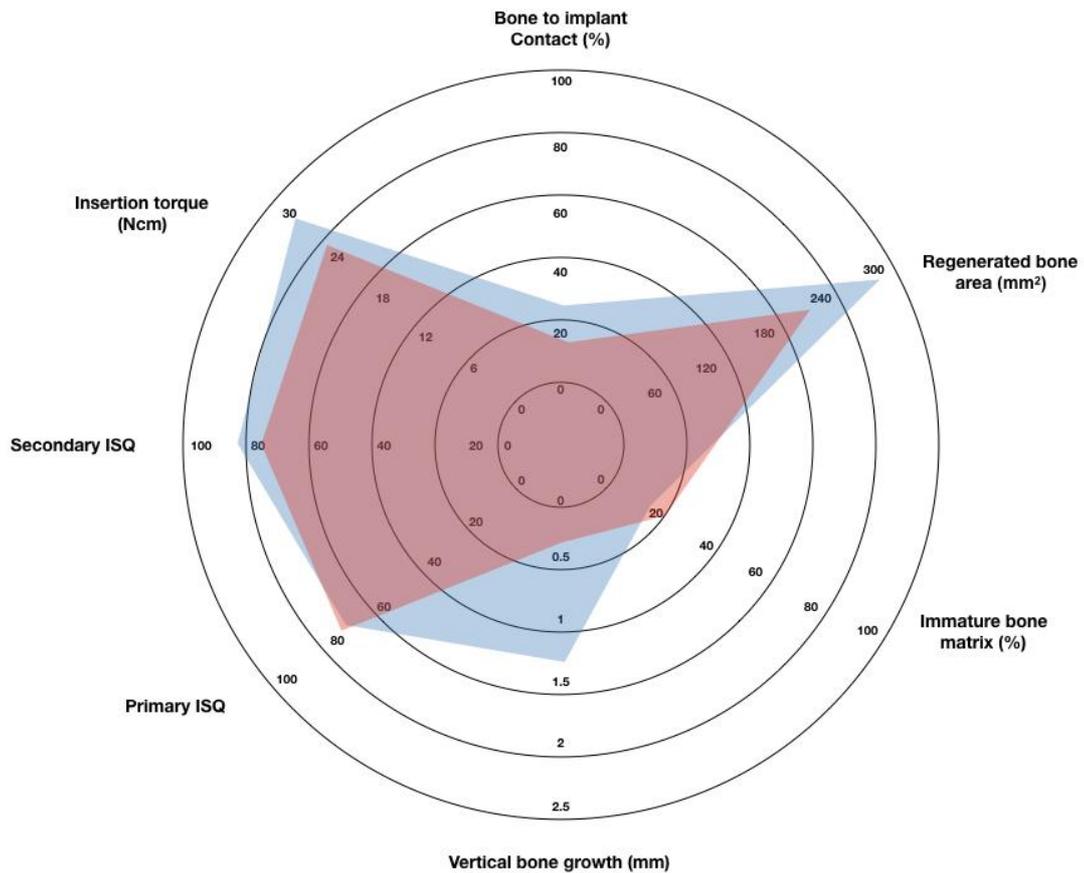


FIGURA 19. En esta gráfica pueden observarse de forma muy visual los resultados de las variables histomorfométricas y de estabilidad, donde el área de color rojo pertenece a los resultados del grupo control, y el área de color azul representa los resultados del grupo test.

DISPOSICIÓN DEL HUESO

Las imágenes obtenidas mediante microscopía (10X) de la histología, muestran una orientación diferente de la matriz ósea periimplantaria, cuando se comparan casos y controles.

En los implantes test, se aprecia una disposición de las fibras de colágeno calcificadas, predominantemente perpendicular al eje longitudinal del implante, sobre el módulo de la cresta, a nivel de las microespiras. Por su parte, en los controles, las fibras se disponen de forma paralela al implante (**Figura 20**) y además, el hueso formado presenta cambios en los depósitos de la matriz, más desorganizada, con acúmulos de color más oscuro, casi negros, terminando en la superficie ósea con una disposición trabecular con más cavidades vasculares de menor tamaño y presentando los osteocitos rodeados de lagunas más inmaduras.

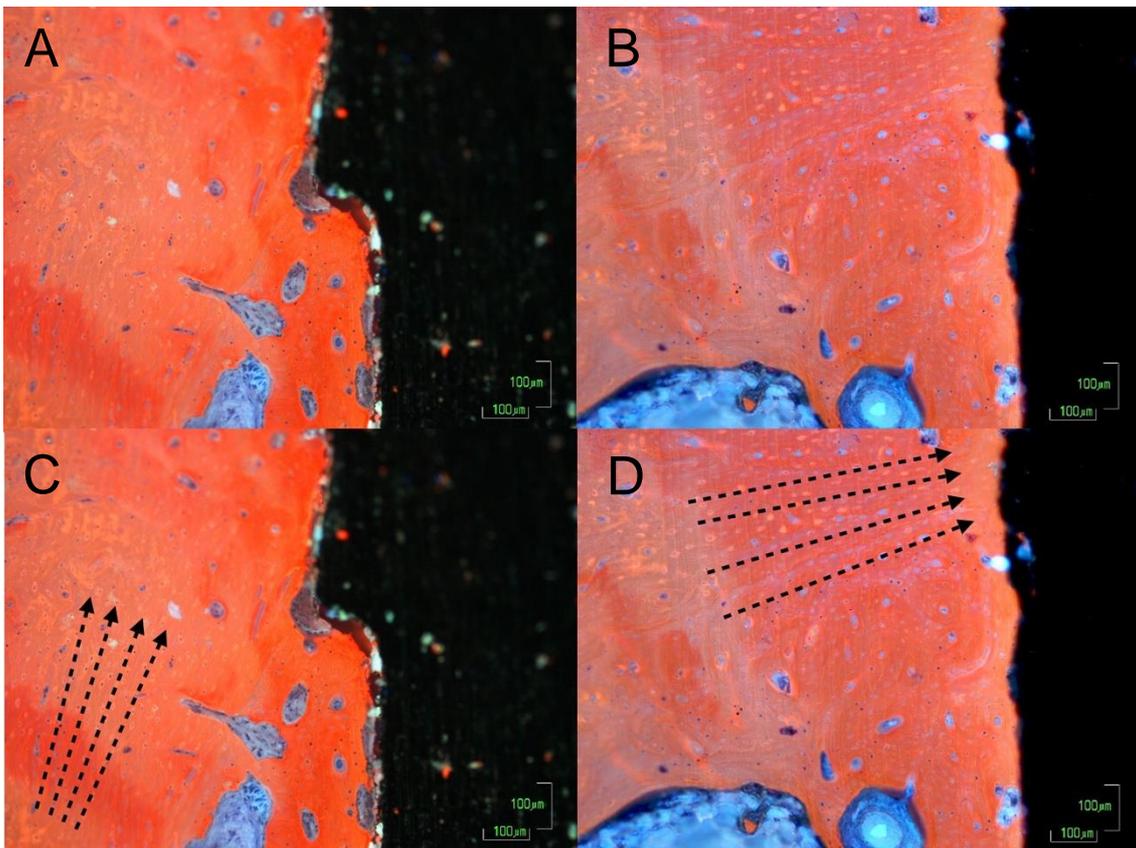


FIGURA 20. Imágenes de microscopía óptica (10x) de una muestra del grupo control (A) y otra del grupo test (B). Las flechas negras señalan la orientación paralela de la matriz respecto al implante del grupo control (C) y la orientación perpendicular respecto al implante del grupo test (D).

6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El presente estudio de investigación, analizó los resultados histológicos e histomorfométricos del hueso formado alrededor de implantes dentales colocados en tibias de conejo y sometidos a carga funcional, así como la evolución de su estabilidad biológica durante el proceso de osteointegración. Dado que desde un punto de vista ético resulta imposible llevar a cabo un estudio clínico en humanos que evalúe los parámetros objeto de este proyecto de investigación, se optó por elegir un modelo de experimentación animal para tal fin.

SOBRE LA METODOLOGÍA EMPLEADA

Elección del modelo animal de experimentación

Los factores determinantes en la elección del modelo animal a utilizar deben incluir: los costos de la adquisición y cuidado de los animales, la disponibilidad, la aceptación por la sociedad, la tolerancia para el cautiverio, el bajo nivel de atenciones en el mantenimiento, el fácil manejo, la resistencia a la infección o a la enfermedad, la uniformidad inter-animal, la presencia de características biológicas análogas a los humanos, la tolerancia a la cirugía, la existencia de una base de datos con información biológica de esa especie, la vida útil de las especies elegidas debe ser adecuada para la duración del estudio y además, el tamaño del animal debe ser adecuado para el número y tamaño de los especímenes a probar.^{141,142}

El presente estudio de investigación se realizó utilizando como modelos de experimentación 10 conejos macho adultos de raza neozelandesa (*Oryctolagus cuniculus*), de 4 meses de edad y con un peso medio de 3.75 kg de peso. La elección del conejo como modelo de experimentación se debe a la abundante bibliografía que lo avala, a la experiencia de los autores en su manejo y al hecho de ser el animal de experimentación más pequeño que permite la colocación de implantes dentales de uso humano. Según Sedlin y cols.,¹⁴³ los humanos y el resto de mamíferos ofrecen respuestas biológicas similares a los estímulos biomecánicos, y el hueso cortical de los conejos se remodela tres veces más rápido que el hueso cortical humano. Por lo tanto, el período de experimentación de 6 semanas empleado en este trabajo, correspondería con un período de 18 semanas en el cuerpo humano.

Para el diseño de este estudio se siguió la guía ARRIVE (Animals in Research: Reporting In vivo Experiments) para la presentación de experimentos in vivo en investigación animal,¹³⁹ con la intención de conseguir un estudio más reproducible y una adecuada comunicación de los hallazgos. Esta guía se desarrolló siguiendo la Declaración Consort (normas consolidadas para informar y publicar ensayos) y consiste en una lista de verificación que describe la información mínima que deben incluir todas las publicaciones científicas que informan sobre investigaciones con animales para promover informes completos y de alta calidad, que permitan una revisión crítica de lo que se hizo y lo que se encontró; maximizando la disponibilidad y utilidad de la información obtenida de cada animal y cada experimento, evitando el uso innecesario de animales en el futuro. Además, durante el diseño y realización de la investigación se ha seguido el principio de las “3Rs” (reemplazo, reducción, refinamiento) para la protección animal en investigación.

Estudio piloto con rata Wistar

En un principio, se valoró la posibilidad de llevar a cabo el estudio utilizando como modelo la rata Wistar, animal de experimentación por antonomasia, y que proporcionaría grandes ventajas debido a su sencilla estabulación, y a su bajo coste económico. La idea inicial era insertar implantes dentales de dimensiones reducidas, fabricados expresamente para este fin, en el maxilar superior de un grupo ratas, para colocar después a la mitad de ellas, una especie de pletina de acero conectada a los implantes, y que permitiera a los animales masticar sobre ella. De esta forma, el 50% de los casos recibirían un protocolo de carga inmediata, constituyendo el grupo test, mientras que el 50% restante de los implantes permanecería sin carga, componiendo el grupo control. Esta primera idea, imitaría el modelo de experimentación llevado a cabo con anterioridad por un grupo de investigación japonés.¹⁴⁴⁻¹⁴⁵

El primer paso que se dio fue realizar un diseño minucioso del implante. La dificultad de este procedimiento residió en dar con las dimensiones adecuadas para poder ser colocado en el maxilar superior de un animal tan pequeño, concretamente en la zona del primer molar superior, consiguiendo una estabilidad primaria suficiente para poder realizar un protocolo de carga inmediata. Después de muchas pruebas, se optó por un diseño de implante de

conexión interna, tipo “bone level”, con un diámetro de 1,8mm y una longitud de 2mm.

A continuación, se diseñó una pletina de acero, que se conectaba al implante mediante un sistema de cementado dentro de la propia conexión del implante, ya que, al tratarse de un diámetro tan reducido, sería completamente inviable fabricar un tornillo pasante que se introdujera en la conexión interna. Dicha pletina, al igual que en el estudio de Nagasawa y cols.,¹⁴⁴ dotaba a la prótesis de una gran extensión en la parte distal del implante, ocupando el espacio de los segundos y terceros molares superiores. De esta forma, no sólo se conseguía dar oclusión y transmitir carga al implante, si no que, además, se hacía en unas condiciones muy desfavorables desde el punto de vista biomecánico (**Figuras. 21-23**)

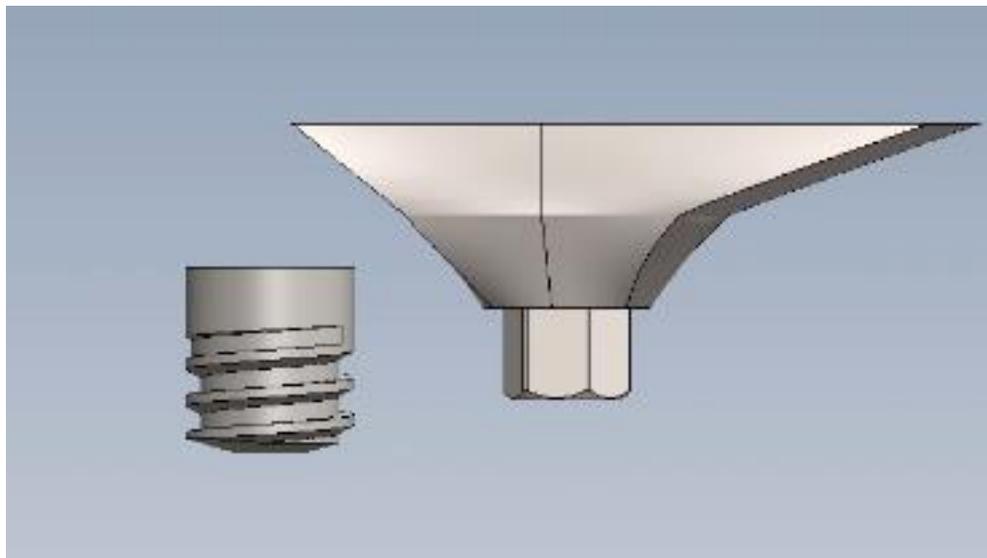
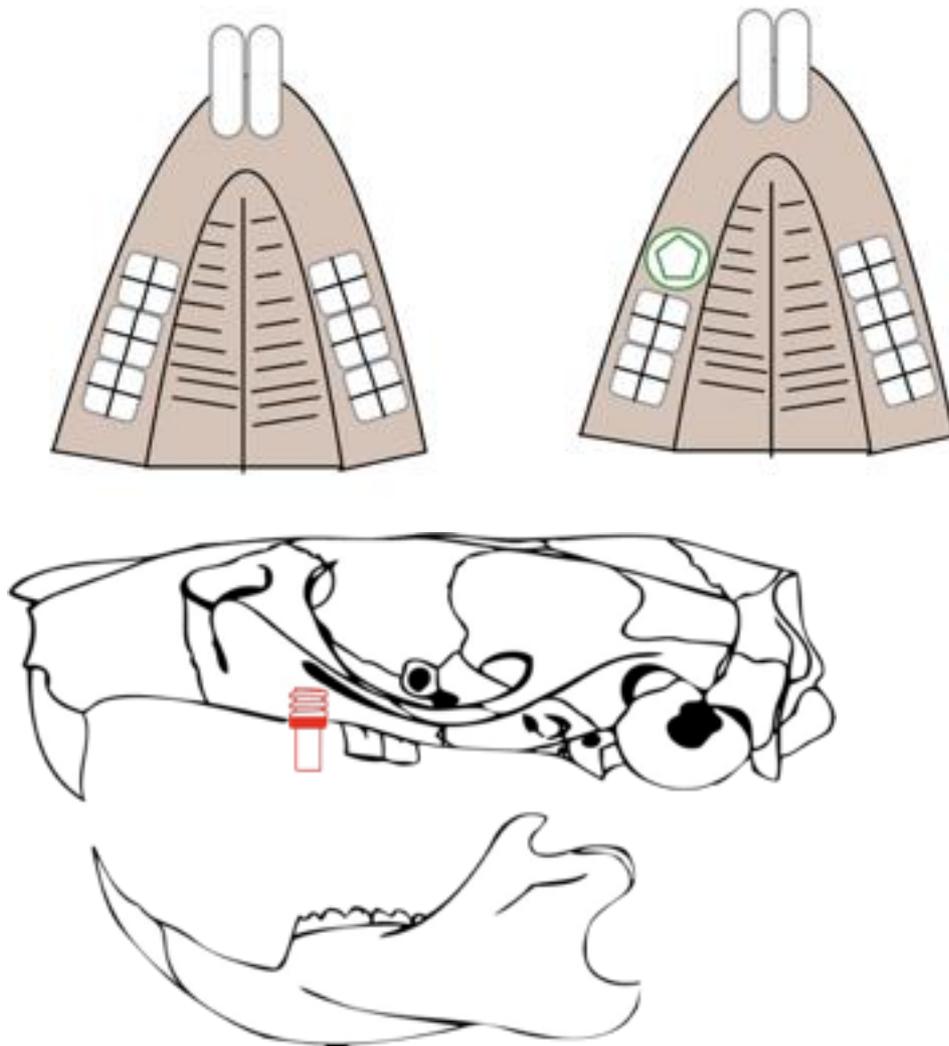


FIGURA 21. *Diseño del implante dental y la pletina que haría la función de prótesis, para ser colocados en el maxilar de una rata Wistar.*



FIGURAS 22 Y 23. Esquema ilustrativo de la posición en la que se colocarían los implantes. Se decidió colocarlos en posición del primer molar superior, con un marcado cantiléver distal que ocupara también la zona de segundo y tercer molar.

El diseño fue mecanizado y fabricado en una aleación de Ti-6Al-4V expresamente para este estudio por una empresa especializada de implantes (Soadco, Escaldes - Engordany, Andorra) (**Figuras. 24 y 25**).



FIGURA 24. *Imagen del implante fabricado en Ti-6Al-4V para el estudio, con la pletina acoplada a su conexión interna.*



Figura 25. *Imagen de la pletina de acero que cumpliría las funciones de restauración protésica.*

A continuación, para comprobar la viabilidad del modelo experimental, se realizó un estudio piloto con dos especímenes de rata Wistar, a los que 4 semanas antes se les había extraído el primer molar superior izquierdo. Dichos animales fueron sedados con una inyección intraperitoneal de Valium (Roche Farma, Madrid, España), Ketolar (Parke Davis, Michigan, EEUU) y Atropina (Braun Medical SA, Barcelona, España) (**Figura 26**).

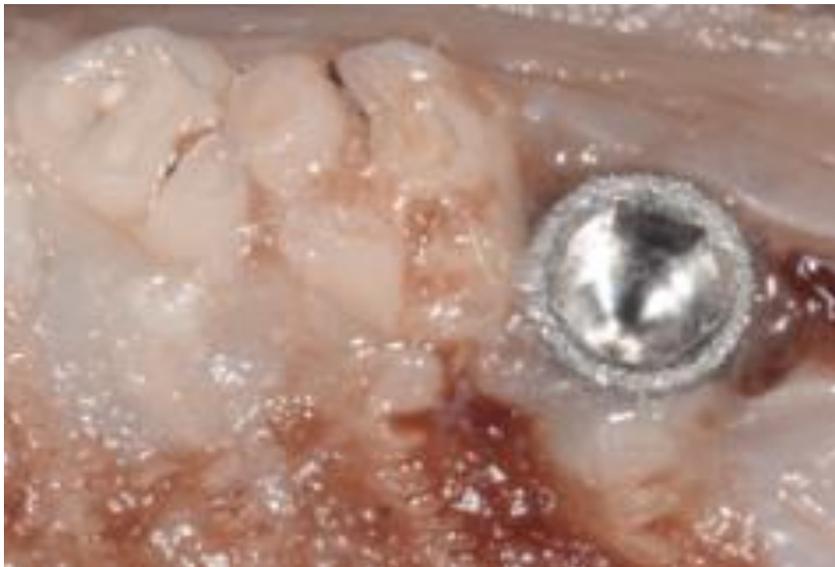


FIGURA 26. *Sedación de uno de los ejemplares de rata Wistar con inyección intraperitoneal.*

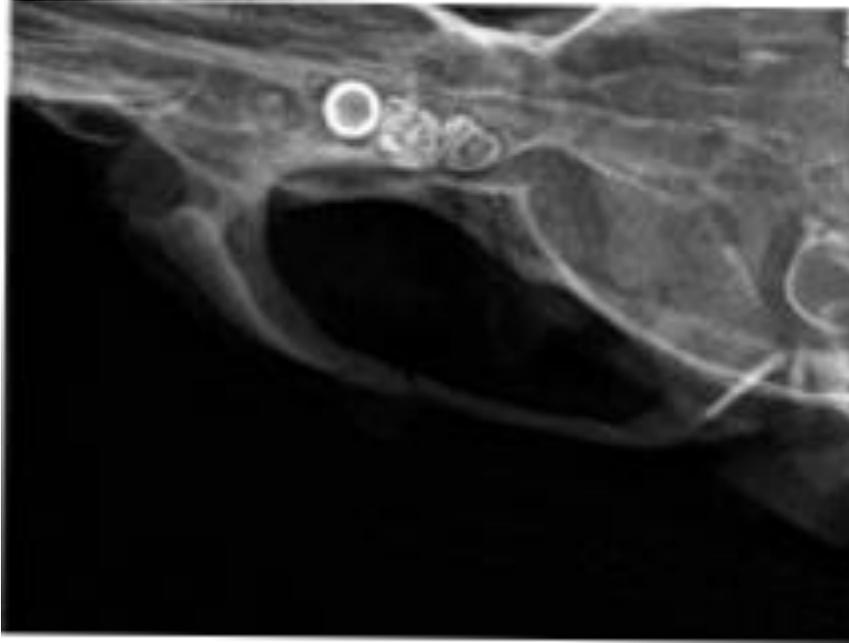
Una vez sedados los animales, se les inyectó anestesia local infiltrativa en la zona a intervenir utilizando para ello hidrocóloruro de articaína con epinefrina 40/0.01 mg/ml (Ultracain; Laboratorios Normon, Madrid, España), y se colocó un implante en cada uno de los ejemplares en posición de primer molar superior izquierdo (**Figuras.27-31**).



FIGURA 27. *Colocación del implante dental en el maxilar superior de uno de los ejemplares de rata Wistar.*



FIGURAS 28 y 29. *Imágenes intraorales del implante colocado en la boca del animal.*



FIGURAS 30 y 31. *Imágenes radiológicas postoperatorias de control obtenidas para comprobar la posición correcta del implante.*

Después de 4 semanas, que está considerado como el período de osteointegración de un implante dental en rata,¹⁴⁶ se volvió a sedar a los animales, y tras realizarles las exodoncias del segundo y tercer molar superior izquierdos, se cementó con Ketac Cem (3M, Minnessota, EEUU) la pletina protésica en la conexión interna del implante previamente colocado **(Figura 32)**.



FIGURA 32. *Imagen intraoral de la pletina protésica cementada en boca sobre el implante osteointegrado.*

2 semanas después, ambas ratas fueron sacrificadas con una inyección letal de pentobarbital sódico, y se comprobó que, en ambos casos, tanto la pletina protésica como el implante, permanecían en boca en su posición original. Este estudio piloto fue presentado por el autor de este trabajo como comunicación oral en el Congreso Anual de la Sociedad Española de Prótesis Estomatológica (SEPES), celebrado en Bilbao en el año 2016. (Ver Anexos).

Sin embargo, el estudio piloto sirvió para comprobar, que el modelo experimental no era un modelo totalmente válido para desarrollar los objetivos que perseguía este proyecto de tesis doctoral. A pesar de conseguir la osteointegración del implante, esta no se produjo en toda la superficie del implante, habiéndose rodeado parcialmente de tejido conectivo. Esto, unido a la baja estabilidad primaria obtenida en los implantes, suponía un gran riesgo de fracaso en aquellos casos en los que se fuera a realizar el protocolo de carga inmediata. Además, tanto el protocolo quirúrgico como el protésico entrañaban una gran complejidad técnica, debido al minúsculo tamaño, tanto del espécimen, como del complejo implante-prótesis. Esto hacía que, en manos del autor, resultara imposible controlar la oclusión del animal, y como consecuencia, no se podría garantizar que todos los animales ejercieran una fuerza de masticación

similar sobre el implante. Por todos estos motivos, el autor y los directores de esta tesis, decidieron que lo más razonable era buscar otro modelo de estudio que se adaptara de forma más precisa a los objetivos del estudio.

Valoración del perro y el cerdo como modelos de estudio

Para evitar los inconvenientes asociados al pequeño tamaño de la rata, se valoró la posibilidad de utilizar animales de mayor tamaño, que permitieran la utilización de implantes dentales de uso humano, así como el instrumental específico asociado a este tipo de implantes, con el que el autor y su equipo de investigación están fuertemente familiarizados. El perro es uno de los animales más frecuentemente usados en investigación dental y musculoesquelética.^{141,147} En la literatura actual, existe una fuerte evidencia científica comparando el hueso humano y el canino, con respecto a la utilidad de este animal como animal de experimentación en ortopedia. Respecto a su tamaño, tanto el instrumental como los implantes de uso humano disponibles comercialmente, se pueden emplear en este modelo.¹⁴¹ En cuanto a la microestructura, mientras el hueso humano adulto tiene una estructura de osteonas secundarias, el hueso del perro tiene una microestructura mezcla de osteonas secundarias y hueso plexiforme.¹⁴⁸ A pesar de la similitud en la composición ósea, el hueso del perro tiene significativamente mayor densidad mineral que el hueso humano,¹⁴⁸ puede soportar una mayor resistencia a la compresión antes de fallar^{141,149} y posee una mayor tasa de remodelado.¹⁴¹ Aunque la mayor parte de la literatura sostiene que el perro es el más adecuado como modelo de comparación con el hueso humano, desde un punto de vista biológico, existen cada vez más problemas éticos relacionados con el uso de perros en la investigación médica debido a su condición de animales de compañía.¹⁴¹ En el caso personal del autor de esta tesis, este último factor condicionó absolutamente la elección del modelo de experimentación, ya que, por principios éticos, descartó rotundamente la utilización de perros para su proyecto de investigación.

En cuanto a los cerdos se consideran los modelos que mejor representan los procesos de regeneración ósea humana debido a la similitud en la anatomía, morfología, capacidad de cicatrización, tasa de regeneración, remodelado y densidad mineral.^{150,151} Aunque el hueso porcino cuenta con una red trabecular más densa, la estructura ósea laminar es similar a la de los humanos.^{141,151} Estos animales han sido empleados con anterioridad en estudios

de implantes dentales rehabilitados con carga inmediata.^{134,152-155} Las razas comerciales de cerdos generalmente se consideran no adecuadas para la investigación ortopédica debido a sus grandes tasas de crecimiento y su excesivo peso corporal final.¹⁴¹ El desarrollo de los “minipigs” ha superado este problema hasta cierto punto.¹⁴¹ Sin embargo, los cerdos son a menudo considerados difíciles de manipular, ruidosos y agresivos^{141,151} y por lo tanto, en ciertas ocasiones, se desestiman en favor de especies más dóciles como la oveja y la cabra. En nuestro caso particular, el cerdo fue desechado como modelo de estudio debido a su difícil manipulación, a la falta de experiencia de nuestro equipo de investigación en su manejo, y a su alto precio, que disparaba los costes del proyecto de investigación y hacía imposible su ejecución.

Cabe añadir, que los patrones de masticación de perros y cerdos, especialmente los primeros, dista mucho de asemejarse al de los humanos, ya que prácticamente sólo utilizan los dientes para cortar y desgarrar, y degluten los alimentos sin masticar. De esta forma, la dinámica de carga que recibirían los implantes colocados en estos animales, no se parecería mucho a la que reciben los implantes colocados en los huesos maxilares humanos.

Idoneidad del conejo como modelo de investigación

Con la excepción de los roedores, los conejos son los animales empleados en investigación con menor similitud a los humanos. Aunque la macroestructura y microestructura de los huesos del conejo es diferente al hueso humano^{141,156,157} y el proceso de formación, remodelado y recambio óseo es más rápido,^{141,156-158} los conejos son comúnmente usados para el screening de materiales de implantación previo al ensayo en modelos animales más grandes.^{141,157,159} De hecho, el conejo es uno de los animales más utilizados para la investigación médica, y se utiliza en aproximadamente en el 35% de los estudios de investigación musculoesquelética.^{141,160} Debido a su tamaño y temperamento los conejos son fáciles de manejar,^{141,151} de mantener y de observar. Son más económicos que los animales de gran tamaño¹⁵⁶ y son mejor aceptados como animales de experimentación por el público general.¹⁴¹ También es ventajoso el hecho de que los conejos alcanzan la madurez esquelética rápidamente, poco después de la madurez sexual, alrededor de los 6 meses de edad.^{151,160} La raza de conejos blancos neozelandesa es usada comúnmente

para la investigación, siendo esta raza menos agresiva en la naturaleza y teniendo menos problemas de salud en comparación con otras razas.¹⁵⁶

Aunque los conejos son pequeños comparado con ovejas, cabras o cerdos, son suficientemente grandes para colocar múltiples implantes e incluso de uso humano, no siendo esto posible en las ratas o ratones. La colocación de múltiples implantes limita el número de animales necesarios para cada experimento y hace posible usarlos como sus propios controles.^{159,162}

El extendido uso y documentación de los conejos en la investigación biomédica hacen al modelo cada vez más atractivo para el análisis in vivo del comportamiento óseo alrededor de los implantes dentales. Además, las cuestiones económicas, científicas, prácticas y éticas hacen del conejo un modelo ideal para estudios de nuevos implantes y materiales de injerto. Las diferentes ubicaciones anatómicas de fácil acceso con cicatrización ósea endocondral (fémur, tibia) e intramembranosa (cráneo, mandíbula) permiten la prueba y el análisis de materiales en diferentes condiciones fisiológicas.¹⁵⁷

ELECCIÓN DE LA ZONA DE COLOCACIÓN DE LOS IMPLANTES

Conviene tener en consideración que la mayoría de estudios con conejos, roedores, ovejas o cabras usaron modelos extraorales, siendo por el contrario más habituales los abordajes intraorales en perros y cerdos.¹⁴⁷

Puede llamar la atención que siendo un estudio realizado con implantes dentales y basando sus objetivos en analizar el comportamiento del hueso periimplantario frente a la aplicación de carga sobre ellos, se haya optado por elegir una ubicación extraoral para su colocación, en detrimento de una zona intraoral como se hizo en el estudio piloto con las dos ratas Wistar. Esto debe su justificación, al igual que con las ratas, a la dificultad que supone colocar implantes dentales de uso humano, de dimensiones convencionales en los huesos maxilares de los conejos. Aunque estos animales presentan una arquitectura ósea maxilar de tamaño considerablemente superior al de las ratas Wistar, este tamaño sigue siendo inadecuado para la inserción de implantes comerciales de uso humano. La región posterior del maxilar superior fue descartada por este motivo, ya que resultaba imposible colocar implantes sin invadir los senos maxilares. En la región posterior de la mandíbula, sin embargo, el impedimento encontrado fue otro. La peculiar anatomía del conejo hace que los incisivos inferiores, diseñados para roer y encontrarse permanentemente en

continuo proceso de extrusión, posean unas raíces muy largas, cuyo recorrido llega hasta las raíces de los molares inferiores (**Figura 33**). Por lo tanto, en la zona del diastema mandibular, entre incisivos y molares, existe disponibilidad ósea suficiente para la colocación de implantes dentales de uso humano, sin embargo, la presencia de las raíces de los incisivos, imposibilitan dicha colocación sin colisionar con estas estructuras. Por este motivo, al igual que en el maxilar superior, también queda descartado el sector posterior mandibular.

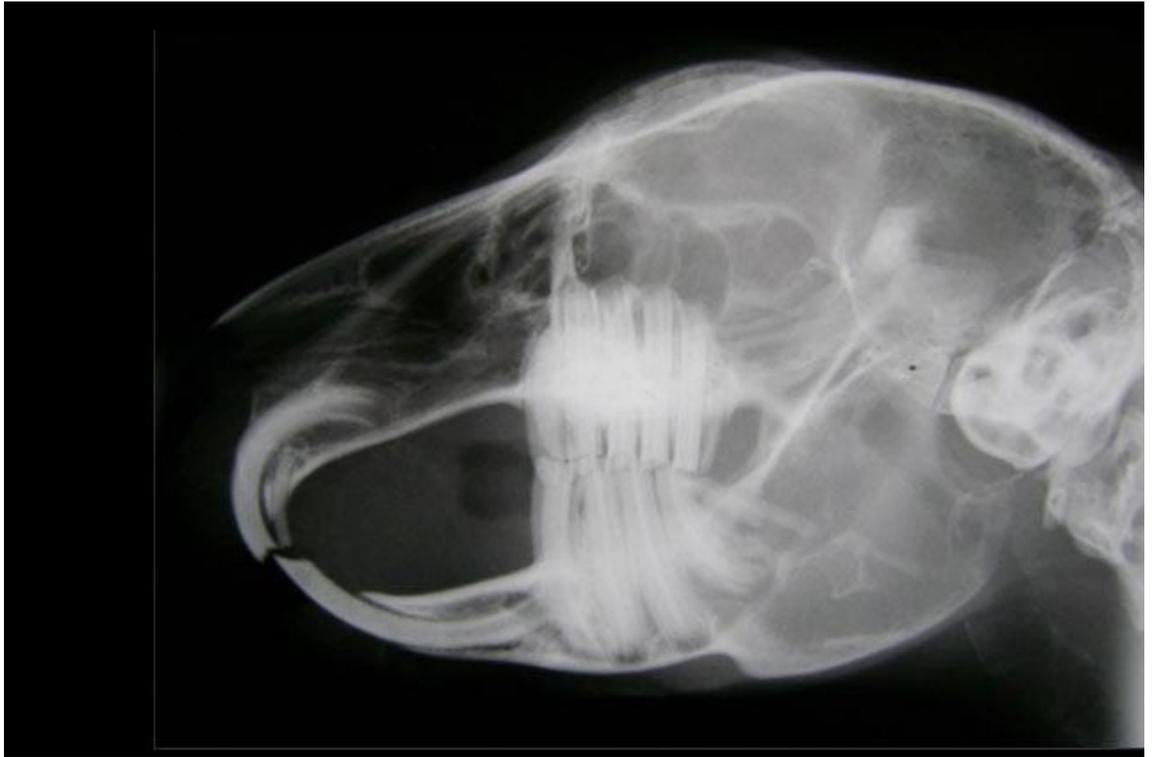


FIGURA 33. *Imagen radiográfica de la cabeza de un conejo, en la que pueden apreciarse la singular forma y longitud de las raíces de los incisivos inferiores.*

La última posibilidad de colocar implantes de uso humano en la boca del conejo, sería su colocación en zona anterior. Existen algunos artículos publicados que describen la inserción de implantes inmediatos en los alveolos de los incisivos inferiores de los conejos.¹⁶³⁻¹⁶⁵ A priori, esta puede parecer una buena ubicación, ya que como hemos descrito anteriormente, los incisivos inferiores poseen unas raíces de tamaño extralargo, que, al ser extraídas, dejan unos alveolos profundos donde poder colocar los implantes.

Para poder explorar esta vía, se realizó un estudio piloto en modelo animal ex vivo, sobre una cabeza de conejo adulto de 6kg de peso. Este estudio no precisó de aprobación de comité de bioética, ya que se utilizó la cabeza de

un animal muerto, destinado a alimentación y procedente de una carnicería convencional (**Figuras 34 y 35**).



FIGURAS 34 y 35. Imágenes del cráneo de conejo utilizado en el estudio piloto ex vivo realizado para comprobar la viabilidad de la región incisiva inferior como zona de colocación de los implantes dentales de uso humano.

Una vez más, el estudio piloto sirvió para comprobar que el modelo de experimentación no era válido para el desarrollo de los objetivos propuestos en el estudio. El motivo fue que, debido al extraordinario tamaño y curvatura de las raíces los incisivos inferiores, la exodoncia de dichas piezas resulta tremendamente compleja, más aún teniendo en cuenta que las paredes del alveolo deben permanecer intactas para permitir la colocación de un implante inmediato post extracción. Además, debido a la particular posición de dicho alveolo respecto al maxilar superior, en caso de realizar una rehabilitación protésica para la carga inmediata, el eje de la prótesis quedaría prácticamente en una posición de 90° respecto a la del implante, por lo que la transmisión de carga se produciría totalmente perpendicular al eje longitudinal del implante. Esto, no se corresponde con la inclinación de la carga que recibe un implante en ninguna de las posiciones que puede albergar en los maxilares humanos. Por lo tanto, debido a la complejidad técnica del procedimiento, y a su escasa similitud con los humanos respecto al patrón de transmisión de carga al terreno de soporte periimplantario, la región incisiva del conejo también fue descartada para la colocación de los implantes para el estudio. Esto, obligó a buscar una región extraoral, que ofreciera las ventajas del conejo como animal de experimentación, pero eludiendo los inconvenientes que presentaban las regiones intraorales.

En este sentido, el hueso más apropiado para la colocación de implantes de uso humano, por tratarse de un hueso de gran tamaño y fácil acceso quirúrgico es la tibia. La colocación de implantes en tibia de conejo está ampliamente descrita en la literatura, y previo a la realización de este estudio, nuestro grupo de investigación ya contaba con experiencia realizando este procedimiento, así como una publicación científica publicada que lo avalaba.¹⁶⁶

No obstante, uno de los principales inconvenientes de la tibia de conejo es que, si bien es cierto que su reducido tamaño nos permite una mejor manejabilidad quirúrgica, también nos permite la colocación de un número limitado de implantes (se recomienda un máximo de 3 implantes por tibia de hasta 4mm de diámetro) (International Standard ISO 10993-6, 1994). En nuestro caso, nos iniciamos con este modelo animal siguiendo esta recomendación respecto al número de implantes, con un diámetro de 3.5mm. Sin embargo, observamos que se producían fracturas a nivel distal de la tibia. Por este motivo, decidimos usar únicamente 2 implantes por tibia y de 3 mm de diámetro, colocados lo más cerca posible de la meseta tibial. Siguiendo esta metodología

no volvimos a observar más fracturas. Otros de los inconvenientes de la tibia del conejo son sus diferencias óseas a nivel macro, microestructural respecto al hueso humano.

A nivel macroestructural podemos observar diferencias con los huesos maxilares humanos en tamaño y forma, ya que se trata de un hueso prácticamente “hueco”, con mucho contenido de hueso cortical, de alta densidad, pero sin apenas hueso trabecular en su interior. Esto, de alguna manera, dificulta la demostración de la teoría del arbotante óseo, ya que, al carecer de trabéculas óseas en su interior, no se pueden contemplar de forma tan evidente, los puentes óseos que forman las trabéculas para sostener y dar estabilidad a los implantes dentales.

MODELO DE APLICACIÓN DE CARGA SOBRE LOS IMPLANTES.

Cabe destacar, que la metodología del estudio, utilizando una cinta de correr para someter a los animales a la realización de ejercicio físico diario, ha sido descrito en numerosos estudios publicados con anterioridad.^{140,167-169} Aunque en nuestra disciplina sea algo totalmente novedoso, esta metodología es utilizada con frecuencia en ensayos experimentales de cardiología o fisiología. Esta contrastada metodología no supone un gran estrés para los animales, ya que se lleva a cabo siguiendo un estricto protocolo de habituación de los animales a la cinta, garantizando el bienestar animal en todo momento. Es preciso reconocer que el modelo de aplicación de carga del ensayo experimental realizado puede diferir sobre la biomecánica masticatoria, tanto en magnitud como dirección de las fuerzas, como probablemente en el modo en el que se produce la transferencia de tensión al hueso marginal periimplantario. Pese a las diferencias, la carrera en la cinta del grupo test puede ser descrita a nivel biomecánico como dinámica y basada en sucesivas cargas de impacto, precisamente de la misma manera en la que ciertos autores describen a la masticación.¹⁷⁰ Respecto al tiempo de aplicación, hasta 20 minutos diarios, se acerca al tiempo de aplicación diario de las fuerzas masticatorias, que algunos autores consideran de entre 20 - 30 minutos.¹⁷¹ En síntesis, el objetivo de este modelo de estudio fue el de producir un estímulo biomecánico en todo el hueso que rodea los implantes, de la misma manera que la masticación lo induce sobre los huesos maxilares y los implantes que contenga.

En ese sentido, el modelo empleado de carga dinámica, es más próximo a la situación real masticatoria que aquellos estudios, también en tibia de conejo, que aplican cargas de forma estática.^{172,173} Este es un asunto de gran relevancia ya que los resultados de algunos estudios han mostrado que la formación del hueso periimplantario está únicamente influido por las condiciones resultantes de la aplicación de carga dinámica, y no de carga estática.^{174,175} No solo eso, sino que además en el estudio de Han y cols.¹⁷³ del año 2014, el propio implante empleado no respondía a un diseño idéntico al humano, sino que servía al propósito de poder encajar el dispositivo de aplicación de carga, teniendo que provocar para tal fin, más allá de un anclaje bicortical, una salida franca del implante por la cortical apical. Esta colocación del implante, puede modificar sustancialmente la transferencia de carga entre el implante y el hueso.¹⁷³

Por otro lado, en el estudio de Duyck y cols.,¹⁷⁶ se colocaron 40 implantes en las tibias de 8 conejos. En algunos de estos implantes, los autores ejercieron ciclos de carga dinámica aplicando una fuerza transversal de 14,7 N, con una frecuencia de 1Hz durante 2 semanas. En la primera semana aplicaron 90 ciclos de carga por día, mientras que en la segunda aplicaron 270 ciclos por día. Sin embargo, parece evidente que la dirección de la aplicación de la carga, totalmente perpendicular al eje del implante, nada tiene que ver con la dirección de las fuerzas oclusales que transmiten la carga sobre los implantes durante la masticación. El problema es de importancia en la medida en que las fuerzas de compresión son de naturaleza anabólica, mientras que las deformaciones torsionales y de cizallamiento no tienen ningún efecto¹⁷⁵ o se correlacionan negativamente con el crecimiento óseo hacia estructuras porosas.¹⁷⁷

Además, el número de ciclos de carga por día no se corresponde con el número de ciclos masticatorios de un paciente promedio,¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ y el período de estudio, de sólo 2 semanas, podría ser insuficiente para una completa oseointegración, ya que equivaldría a un período de 6 semanas en humanos. Estos motivos pueden explicar por qué, a diferencia de los resultados de nuestro estudio, los autores no encuentran diferencias significativas entre grupos test sometidos a carga y grupos control sin carga. Finalmente, en otros estudios, los autores aplicaron una carga dinámica sobre los implantes durante 3 semanas, pero solamente 2 veces por semana, lo que evidentemente no reproduce correctamente los tiempos de carga que reciben los implantes durante la masticación y al igual que el trabajo de Duyck¹⁷⁶ pueden quedar por debajo del

umbral de la estimulación. Además, estos ciclos de carga se aplicaron una vez superado el período de osteointegración, lo que imita un protocolo de carga diferida, y no de carga inmediata como el aplicado en nuestro estudio.¹⁸¹⁻¹⁸³

Estudio piloto con implantes en tibia de conejo

Al tratarse de una metodología novedosa en el campo de la implantología oral, se decidió llevar a cabo un estudio piloto con un conejo test y un conejo control, previo a la realización del estudio con un tamaño de muestra completa. La metodología empleada para este estudio piloto fue la misma que se ha explicado anteriormente en el apartado de material y métodos para el estudio con muestra completa, y se realizó bajo supervisión y aceptación del Comité de Bioética para la Investigación Animal de la Universidad de Oviedo, con el código de autorización 7/2018 (Oviedo, Asturias, Spain).

Este estudio piloto, sirvió para comprobar que el modelo de experimentación elegido era válido, y la metodología empleada era correcta. Ambos especímenes sobrevivieron tanto a la intervención quirúrgica, como a la fase de estabulación posterior, con uno de ellos realizando ejercicio físico diario sobre la cinta de correr. Además, más allá de comprobar la validez del modelo experimental, los resultados obtenidos en este estudio piloto animaron enormemente al autor de la tesis a seguir investigando por esta vía, ya que a pesar del pequeño tamaño muestral (4 implantes test, 4 implantes control), se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, tanto en valores ISQ como en BIC. Estos resultados fueron presentados por el autor en una conferencia impartida en el Congreso de la Sociedad Científica de Odontología Implantológica (SCOI), celebrado en Valladolid en junio de 2019 (Ver Anexos). Además, el estudio piloto sirvió para dar con un hallazgo causal, que más tarde sería incorporado al estudio completo como un parámetro más a analizar entre ambos grupos. A diferencia del estudio con tamaño de muestra grande, en el estudio piloto, tras la inserción de los implantes en las tibias de los conejos, se les colocó unas tapas de cierre planas, sin altura. Sin embargo, en el momento del sacrificio de los animales, se observó que en la mayoría de ellos se había producido un sobrecrecimiento óseo por encima de los implantes, dificultando el acceso a la tapa en muchos de los casos. Más concretamente, se observó que se había formado una mayor cantidad de hueso sobre los implantes del conejo test que sobre los implantes del conejo control (**Figuras.36 y 37**).



FIGURA 36. Fotografía de la tibia de un conejo del grupo control del estudio piloto en el momento de la eutanasia. Apréciase la delgada capa de hueso formada por encima de ambos implantes dentales.



FIGURA 37. Fotografía de la tibia de un conejo del grupo test del estudio piloto en el momento de la eutanasia. En el momento de la fotografía, el implante de la

izquierda había sido descubierto, eliminando la capa de hueso formada por encima suyo. Sin embargo, puede apreciarse como el implante de la derecha estaba totalmente sumergido, cubierto por una gruesa capa de hueso.

Sin embargo, se trataba de una observación empírica, totalmente subjetiva, que difícilmente podría presentarse en el apartado de resultados del estudio. Por este motivo, de cara a la realización del estudio completo con un tamaño de muestra mayor, se decidió medir este crecimiento óseo de manera cuantitativa. Para ello, se solicitó a la empresa fabricante de los implantes (Soadco, Escaldes-Engordany, Andorra) la fabricación de unos pilares de cicatrización *ad hoc*, con 4 marcas hechas con láser con una separación de 0,5mm entre ellas. De esta forma, tal y como se ha descrito en el apartado de material y metodología, en el momento del sacrificio de los animales, se podría saber de forma sencilla y objetiva, cuanta cantidad de hueso había crecido verticalmente sobre el implante.

DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS IMPLANTES

Los resultados obtenidos revelan una tasa de supervivencia del 100% antes de la carga, lo que coincide plenamente con los resultados de otros artículos que también describen en su metodología la colocación de implantes dentales en tibia de conejo.^{166, 184,185}

Estos resultados superan ligeramente la tasa de supervivencia de los implantes dentales durante la osteointegración que describe la literatura científica actual en humanos (95-99%).¹⁸⁶

Por ejemplo, en un reciente estudio clínico retrospectivo publicado por Brizuela-Velasco y cols.,¹⁸⁷ con una muestra de 297 implantes colocados en 110 pacientes la supervivencia de los implantes antes de la colocación de la prótesis fue del 97,6%. Si buscamos evidencia científica con un tamaño muestral mayor, otro estudio clínico prospectivo publicado por Rodrigo y cols.³¹ en el año 2010, revela una tasa de supervivencia del 98,95% con una muestra de 4114 implantes colocados en 1680 pacientes.

DEL CRECIMIENTO ÓSEO VERTICAL

El sistema utilizado para la medición del crecimiento óseo por encima de los implantes es una metodología totalmente novedosa, ideada por el autor para dar respuesta a la necesidad surgida por la observación de los resultados del estudio piloto y no ha sido descrita antes en la bibliografía. Sin embargo, como puede comprobarse en las fotografías, este estudio demuestra que es un método válido para este tipo de mediciones, y abre la puerta a su utilización en futuras investigaciones, considerándolo el autor especialmente interesante para estudios sobre regeneración ósea vertical.

Otras opciones para medir de forma objetiva este crecimiento habría sido la utilización de radiología 2D o CBCT, siendo este último mucho más preciso y fiable que el primero. Sin embargo, no hay que olvidar que uno de los objetivos de este estudio era el de determinar, mediante AFR, la estabilidad secundaria de los implantes tras la aplicación del estímulo biomecánico. Para llevar a cabo esta medición, es necesario retirar la tapa de cierre del implante, y conectar el transductor denominado Múltipeg atornillado en su conexión interna. Como en la mayoría de los casos, sobre todo en los conejos test, las tapas quedaban totalmente sepultadas por hueso neoformado, sería necesario retirar hueso con una fresa u otro tipo de instrumental para poder acceder a los implantes. Por lo tanto, al realizar un CBCT posterior, no estaríamos midiendo todo el hueso formado por encima del implante, si no simplemente, lo que hubiera quedado tras quitar lo necesario para descubrir el implante.

Por todo esto, la fabricación de unos pilares de cicatrización con marcas de medición, se presentan como la manera más objetiva y menos invasiva de poder cuantificar este parámetro. Además, también cabe tener en cuenta que el crecimiento óseo no se produce al mismo ritmo en todo el contorno del implante, por lo que, a la hora de obtener los resultados, fue muy habitual que alrededor de un mismo implante, hubiera diferentes alturas de crecimiento óseo según la cara del implante analizada. Por este motivo, y para facilitar el análisis estadístico, se decidió obtener dos valores por implante: uno medido en el punto de máximo crecimiento óseo, y otro tomado en punto de mínimo crecimiento óseo.

El primer hallazgo de este estudio, a la hora de recabar los resultados fue la constatación de un mayor sobrecrecimiento óseo por encima de aquellos

implantes que habían recibido estímulo biomecánico. Se trata de un hallazgo totalmente casual, que no estaba planteado en los objetivos iniciales del estudio, pero su descubrimiento tras la realización del estudio piloto sugirió que debía de cuantificarse y ser utilizado como un parámetro comparativo más entre el grupo test y el grupo control. Esta es la primera vez que se describe un crecimiento óseo tan significativo por encima de los implantes dentales sin haber utilizado ningún tipo de material de injerto. Probablemente, este fenómeno pueda deberse al despegamiento del periostio y su posterior reposición por encima de los pilares de cicatrización, lo que ayudó a mantener el espacio subperióstico creado y permitió su relleno con un coágulo sanguíneo, de una manera similar a la descrita en la técnica de regeneración ósea “Tent Pole”.¹⁸⁸ Sin embargo, se aprecia una diferencia relevante entre este estudio y todos aquellos que han sido publicados anteriormente utilizando la técnica de regeneración “Tent Pole”; y es que a diferencia del resto de trabajos, en este estudio se produjo la formación de nuevo hueso por encima de los implantes sin la ayuda de ningún tipo de material de injerto, únicamente gracias a la formación del coágulo sanguíneo y al mantenimiento del espacio subperióstico.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Trasladado a la práctica clínica, este hallazgo podría adquirir una gran relevancia, ya que permitiría ganancias óseas verticales en caso de atrofas maxilares severas, sin necesidad de introducir ningún tipo de injerto óseo como material de relleno. Sin embargo, se necesitan más estudios que evalúen esta técnica y validen su viabilidad en cirugía oral, ya que las diferencias anatómicas entre la tibia del conejo y el maxilar humano son notables, y es probable que el procedimiento no funcione de la misma manera en ambos casos. Sin ir más lejos, la tibia del conejo cuenta con una importante capa de músculo por encima del periostio, además de una piel dura y resistente que cubre lo anterior. Esto hace que el espacio creado por los pilares de cicatrización por encima de los implantes esté perfectamente protegido, y que el riesgo de dehiscencia de la herida sea prácticamente nulo. Sin embargo, en la cavidad oral, por encima del periostio solamente encontramos la encía, mucho más fina y débil que la piel del conejo, y, por lo tanto, mucho más susceptible de sufrir laceraciones y dehiscencias, que en caso de producirse, supondría el fracaso automático del procedimiento regenerativo. Además, en la cavidad oral no existe una capa de tejido muscular por encima del periostio, si no que el tejido conectivo de la encía permanece en contacto directo con él. Esto hace que, en caso de crear un espacio subperióstico con pilares de

cicatrización, casi con toda probabilidad dicho espacio será invadido por el tejido conectivo superior, por lo que, en lugar de conseguir una ganancia ósea en sentido vertical, se conseguirá un aumento del espesor de tejido conectivo. Para evitar esto, sería necesaria la utilización de membranas de barrera, tal y como se describe la técnica tent pole en la literatura. Se necesita realizar estudios de investigación de esta técnica en humanos para poder comprobar su viabilidad, así como analizar las ventajas e inconvenientes que supondría la no utilización de un material de injerto para rellenar el espacio a regenerar.

Las diferencias encontradas entre ambos grupos en la cantidad de sobrecrecimiento óseo fueron estadísticamente significativas, lo que parece mostrar que el estímulo biomecánico provocó un mayor modelado óseo con una actividad osteoblástica intensa en los implantes del grupo A test, que se tradujo en la formación de un mayor volumen de hueso. Estos resultados avalan la teoría de Pauwels,¹⁹³ que en 1965 expuso que el hueso es capaz de ajustarse a los incrementos o descensos de los estímulos biomecánicos adaptando las dimensiones volumétricas de su propia arquitectura. Nuestros resultados siguen la línea de los del estudio de Wiskott y cols.,¹⁹² quienes utilizaron un modelo similar al nuestro, pero aplicando ciclos de carga directos y dinámicos sobre los implantes, una vez superado el período de osteointegración de los mismo. Este estudio presenta limitaciones similares a las mencionadas previamente para el estudio de Duyck y cols.;¹⁷³ aplicación transversal de la fuerza y número de ciclos insuficiente. Sin embargo, los autores observaron que el volumen de hueso cortical en la región interimplantaria aumentó de manera estadísticamente significativa tras la aplicación de la carga. Según los autores, la respuesta del hueso cortical a la tensión aplicada consiste primero en reorganizar su estructura y después en incrementar su masa.¹⁹² Por su parte, en un estudio clínico prospectivo de Liu y cols.,¹⁹⁴ tras la colocación de 107 implantes en 45 pacientes, observaron una ganancia ósea estadísticamente significativa a los 12, 24 y 36 meses postcarga.

DE LA ESTABILIDAD IMPLANTARIA

La medición de la estabilidad implantaria constituye uno de los parámetros clave en este proyecto de investigación. Los resultados del estudio clínico retrospectivo publicado con anterioridad por el autor de esta tesis y su

director, concluían de forma rotunda que la aplicación de carga sobre los implantes dentales provocaba un incremento de sus valores ISQ.¹⁹⁵ Más allá de eso, se demostró que los protocolos de carga inmediata provocaban un mayor aumento de la estabilidad durante la oseointegración, sugiriendo que desde el punto de vista de la oseointegración no sólo no serían nocivos, si no que también podrían resultar beneficiosos. Este hallazgo, empujó al autor a buscar una explicación biológica e histológica a tal fenómeno, y puesto que ningún comité de bioética aceptaría estudiarlo en humanos, se optó por un modelo animal en el que se pudiera observar y analizar el comportamiento del hueso periimplantario durante un procedimiento similar.

El método elegido para medir la estabilidad fue el AFR, por tratarse de un método no invasivo, repetible y reproducible, que proporciona mediciones objetivas de la rigidez de la unión del hueso con el implante, lo que descartaba a otros métodos mencionados en el apartado de la descripción del estado actual del tema, como el periotest, el análisis radiográfico o el test de percusión.¹⁹⁶ Además, a diferencia del torque de inserción, el AFR permite obtener diferentes mediciones a lo largo del tiempo, lo que nos otorga la posibilidad de cuantificar la estabilidad primaria o mecánica, en el momento de la colocación de los implantes, pero también la estabilidad secundaria o biológica en el momento de sacrificar a los conejos. Indudablemente, esta posibilidad le aportaba muchísimo valor al estudio, ya que nos permitía comprobar el efecto que el estímulo biomecánico ejercido sobre el hueso de los conejos test había tenido sobre sus valores de estabilidad secundaria. Esto era de vital importancia para el estudio, ya que, al verse que dichos valores ISQ aumentaban con el ejercicio de los conejos en la cinta de correr, de alguna forma, nos permitía relacionar los resultados con los obtenidos previamente en el estudio clínico retrospectivo, dando validez al modelo de experimentación elegido para el estudio.¹⁹⁵

Los valores de estabilidad primaria obtenidos por los implantes colocados en este estudio fueron de 71,50 ($\pm 3,09$) ISQ en el caso del grupo test, y 72,53 ($\pm 3,67$) en el grupo control. Estos resultados se asemejan considerablemente a los valores obtenidos en otros estudios in vivo realizados con implantes dentales en tibia de conejo, tales como los trabajos publicados por Diéguez-Pereira y cols.¹⁶⁶ ($67,6 \pm 6,1$), Sul y cols.¹⁹⁷ ($68 \pm 1,1$), o Lee y cols.¹⁹⁸ ($74,8 \pm 4,98$). Sin embargo, estos resultados difieren con los de otros estudios, en

los que utilizando diferentes marcas de implantes, obtuvieron valores de estabilidad primaria significativamente más bajos, como por ejemplo, los publicados por Soares y cols.¹⁹⁹ ($51,9 \pm 10,8$), Souza y cols.²⁰⁰ ($48,17 \pm 2,9$), o Gehrke y cols.¹⁸⁵ ($47,8 \pm 3,49$). El motivo de tan baja estabilidad primaria en estos estudios pueda encontrarse en el diseño de los implantes o en la técnica quirúrgica empleada, ya que la colocación de implantes dentales en tibia de conejo es un procedimiento muy sensible a la experiencia del operador. También es preciso señalar que los valores de estabilidad primaria obtenidos por los implantes colocados en este estudio son similares a la media obtenida por los implantes dentales colocados en seres humanos in vivo, tal y como indican el estudio realizado por Rodrigo y cols.³¹ en un estudio clínico con un tamaño de muestra de 4114 implantes colocados en 1680 pacientes ($ISQ\ 73,96 \pm 6,28$), o la revisión sistemática realizada por Lages y cols.,²⁰¹ con 526 implantes colocados con un rango de ISQ de 58 a 73,9.

Durante el período de osteointegración, todos los implantes del estudio aumentaron sus valores de estabilidad, dando lugar al recambio de la estabilidad primaria mecánica por la estabilidad secundaria biológica. Esto coincide con todos los estudios similares anteriormente citados, en los cuales tuvo lugar un aumento significativo de la estabilidad implantaria tras el período de osteointegración, aunque los valores ISQ iniciales fueran significativamente más bajos.^{166,185,197,198,200,202} Esto es debido a que, durante la osteointegración, se produce un aumento de la rigidez de la unión del hueso con el implante, lo que hace que disminuya su capacidad de micromovimiento. Este fenómeno fue explicado por Meredith²⁰³ en el año 1996, mediante un sencillo estudio in vitro con implantes colocados en resina autopolimerizable. El estudio reveló como a medida que la resina iba endureciendo y, por lo tanto, aumentando su rigidez, los valores ISQ de los implantes aumentaban.

En esta línea, los resultados del presente estudio muestran también que los valores de estabilidad implantaria ISQ, medidos mediante análisis de frecuencia de resonancia aumentan de manera estadísticamente significativa durante la osteointegración. Sin embargo, este aumento es superior en los implantes del grupo test, lo que pone en valor la influencia del estímulo biomecánico en la estabilidad biológica de los implantes dentales. Los resultados concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo de investigación en un estudio

clínico retrospectivo publicado con anterioridad.¹⁹⁵ En dicho estudio se mostró que la carga de los implantes favorece el aumento de su estabilidad medida mediante AFR. Con una muestra total de 93 implantes, se midió la estabilidad implantaria de implantes rehabilitados con carga inmediata (n=28) y con carga diferida (n=65), comprobando que en los implantes con carga inmediata el aumento de los valores ISQ era significativamente superior que en los del grupo de carga diferida. No sólo eso, si no que también se observó que el mayor aumento de la estabilidad en el grupo de carga inmediata se produjo durante el período de osteointegración (primeras semanas), mientras que en el grupo de carga diferida el mayor aumento se consiguió después de la rehabilitación protodóncica (después de 12 semanas). Parecidos resultados obtuvieron Akoglan y cols.,²⁰⁴ en un estudio clínico prospectivo con 39 implantes unitarios en el maxilar posterior de 39 pacientes. En este estudio, los implantes rehabilitados mediante protocolos de carga inmediata o temprana consiguieron valores ISQ significativamente superiores durante el proceso de osteointegración que aquellos rehabilitación con carga diferida, además de una mayor densidad ósea en el área periimplantaria. Existen otros estudios publicados, que aunque no compartían nuestros objetivos, también midieron la estabilidad implantaria mediante AFR en el momento de colocación de la prótesis, así como 6 y/o 12 meses después de la carga.^{205,206} Los resultados de estos estudios también demostraron que la estabilidad implantaria aumenta tras la aplicación de carga.

En cuanto a la relación del torque con los valores ISQ, este estudio demuestra que no existe una correlación estadísticamente significativa entre ambos parámetros. Este hallazgo coincide con los resultados obtenidos en otros trabajos en los que ha participado el autor, así como con la última revisión sistemática publicada al respecto.^{90,166,201} Esta observación tiene una importante relevancia clínica, ya que son muchos los clínicos que utilizan el torque de inserción como método de medición de la estabilidad implantaria, utilizando e interpretando sus valores para la toma de decisiones sobre los protocolos quirúrgicos y protésicos a seguir una vez colocado un implante dental. Sin embargo, la literatura demuestra que ambos parámetros no muestran una correlación estadísticamente significativa, por lo que, en muchas ocasiones, el torque de inserción no expresa la estabilidad primaria real del implante, es decir,

su ausencia de micromovimiento, sino que simplemente enuncia la resistencia que encuentra a avanzar girando dentro del hueso en sentido apical.

DEL ANALISIS HISTOMORFOMETRICO Y DEL CONTACTO HUESO-IMPLANTE (BIC)

En el presente estudio, tras embeber en metilmetacrilato las muestras sin descalcificar, se cortaron y se tiñeron con Azul de Stevenel y picrofucsina de Van Gieson. La tinción azul de Stevenel contiene azul de metileno y permanganato de potasio y la tinción de picrofucsina de Van Gieson contiene fucsina ácida y ácido pícrico. Esta tinción está formulada para la penetración y tinción de muestras incrustadas en polímeros, es muy estable y permite analizar las muestras sin descalcificar y que contengan elementos metálicos.²⁰⁷

Las técnicas histológicas sin descalcificar se han impuesto en el análisis de las técnicas de aumento óseo, en el análisis de la aposición ósea a diferentes biomateriales, así como en la valoración y cuantificación de la aposición ósea sobre implantes aloplásticos.²⁰⁸

La descalcificación que se realiza con frecuencia a las muestras de tejido óseo para la obtención de un tejido suficientemente blando para su inclusión en parafina y posterior análisis histológico tiene una serie de inconvenientes debido a la modificación que sufre la muestra, entre ellos no permite distinguir entre el hueso mineralizado y no mineralizado haciendo imposible la cuantificación del tejido osteoide o tejido óseo inmaduro. Con el desarrollo técnico de medios duros de inclusión (monómeros plásticos), de microtomos y sistemas de corte especiales se ha permitido cortar el hueso sin descalcificarlo y de esta manera permitir un análisis de la muestra con una menor alteración por el procesado. Las muestras no descalcificadas nos permiten diferenciar adecuadamente diversos linajes celulares (OCs. en zonas de resorción, OBs. asociados al osteoide, osteocitos) y el hueso neoformado inmaduro del hueso remodelado maduro. Con esta técnica se puede valorar la formación y maduración del hueso de manera cronológica.

La tinción que se empleó en este ensayo (Azul de Stevenel/Picrofucsina de Van Gieson) es excelente para demostrar formación osteoide y aposición directa de hueso sobre un biomaterial.²⁰⁹ El aspecto final del color de las

secciones histológicas fotografiadas puede variar según la fuente de luz, el tipo de película, el grosor de las secciones y la corrección del color con filtros.²⁰⁷

Sin embargo, los especímenes histológicos no pueden mostrar una representación precisa de la estructura ósea tridimensional.²¹⁰ Otras posibles limitaciones de la histología que se han descrito son: ser relativamente subjetiva, no ser realmente cuantitativa, permitir sólo un análisis en dos dimensiones (sin información de la disposición geométrica) y analizar sólo una sección de toda la muestra que no necesariamente tiene que ser representativa del total de la muestra.^{211,212}

En relación al contacto hueso-implante valorado por histomorfometría, los resultados obtenidos muestran que el estímulo biomecánico del hueso periimplantario aumenta el porcentaje de contacto entre el hueso y el implante en los implantes del grupo test, siendo esta relación ya había sido ampliamente demostrado en estudios anteriores realizados en modelo animal y puede traducirse como una mejora de la osteointegración bajo la carga.²¹³⁻²¹⁵

En el estudio de Moon y cols.,²¹³ en el año 2007, se colocaron un total de 50 implantes en 5 perros, y se dividieron en 3 grupos, en función del protocolo de carga seguido en cada uno de ellos: sin carga (control), carga temprana o carga inmediata. 16 semanas después, los animales fueron sacrificados, y se analizó la ratio de hueso formado sobre la superficie de los implantes. Los resultados obtenidos demostraron que existían diferencias estadísticamente significativas en el BIC entre los 3 grupos, consiguiéndose el mayor porcentaje de contacto hueso-implante en aquellos que habían recibido carga inmediata ($73,37 \pm 15,67\%$), superando ampliamente a los que habían permanecido sin cargar ($62,04 \pm 12,82\%$).

Por su parte, Romanos y cols.,²¹⁴ publicaron en el año 2003 un estudio realizado en 9 monos a los que habían colocado un total de 48 implantes dentales de uso humano. Al igual que en el estudio de Moon previamente mencionado, los implantes se dividieron en 3 grupos: sin carga, con carga inmediata y con carga diferida. 3 meses después, los animales fueron sacrificados para llevar a cabo el estudio histológico e histomorfométrico del hueso perrimplantario. Coincidiendo con los resultados de esta tesis, Romanos y cols. demostraron que los implantes que habían recibido carga, tanto inmediata como diferida, alcanzaban porcentajes de BIC superiores a aquellos que habían permanecido sumergidos sin carga ($64,25 \pm 0,65\%$ y $67,93 \pm 1,60\%$ vs

50,20±9,06% respectivamente). Como conclusiones del estudio, los autores afirman que la carga de los implantes podría haber estimulado la formación de hueso, y que esto supone un factor clave para favorecer la osteointegración. Además, subrayan que los implantes con carga inmediata pueden osteointegrarse de igual forma que los implantes con carga diferida.

Por último, Podaropoulos y cols.,²¹⁵ en el año 2015 publicaron un estudio in vivo utilizando 3 perros Beagle como modelo de experimentación. Les colocaron un total de 24 implantes dentales en la mandíbula y los dividieron en dos grupos de estudio. La mitad de los implantes permanecieron sumergidos, cicatrizando durante 8 semanas sin ser manipulados, por lo que constituyeron el grupo control. Los otros 12 implantes, recibieron la colocación de pilares protésicos, que fueron unidos con alambre de ortodoncia, y sobre los que se aplicó una carga estática de 100, 200 y 300gr durante 3 semanas cada carga. Los resultados demostraron que los implantes que habían recibido la carga progresiva, mostraban un mayor BIC (49,73%) que aquellos que habían permanecido sin carga durante todo el estudio (32,85%).

Sin embargo, es conveniente reseñar que otros autores no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los implantes con carga y sin ella.^{153,155}

Es el caso de Nkenke y cols.,¹⁵⁵ que en el año 2003, realizaron un estudio de carga inmediata en 7 minipigs. Para ello, colocaron 5 implantes dentales en el lado izquierda de la mandíbula de cada animal. 4 de los implantes fueron cargados con una prótesis fija, mientras que el implante restante se dejó sin cargar. Tras un período de osteointegración de 4 meses, los animales fueron sacrificados, y todos los implantes fueron retirados junto al hueso circundante a cada uno de ellos. Al contrario que en el estudio de esta tesis doctoral, los resultados de la histología de este artículo no encontraron diferencias estadísticamente significativas en el BIC entre los implantes que habían recibido carga (77,8±17,3) y los que no (78,0±5,8).

Por otro lado, en un estudio de Liñares y cols.,¹⁵³ se colocaron 24 implantes en la mandíbula de 8 minipigs para comparar las diferencias histológicas entre un grupo de implantes rehabilitados con carga inmediata y otro grupo rehabilitado con carga diferida. Los resultados indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas en el BIC entre ambos grupos (66,1±1,3 vs 65,1±6,2), pero a diferencia de nuestro estudio, todos los implantes

analizados fueron sometidos a carga (inmediata o diferida), por lo que no se puede saber si un hipotético grupo control sin carga hubiera obtenido valores inferiores de BIC.

En este estudio, el efecto de la carga aplicada en la formación de tejido duro alrededor de los implantes resultó muy evidente, con diferencias significativas entre ambos grupos en la cantidad de hueso neoformado sobre la superficie del implante (group A $280,50 \pm 125,40$; group B $228,00 \pm 141,40$; $p < 0,05$). Esto muestra que el estímulo biomecánico del hueso periimplantario influye positivamente en el proceso de osteointegración, pues activa los mecanismos celulares y moleculares encargados del modelado óseo. Este hallazgo concuerda con los datos obtenidos en otros estudios histomorfométricos llevados a cabo en diferentes modelos animales.^{172,173}

Y, pese a que los resultados muestran mayores valores ISQ y porcentajes de BIC para los implantes del grupo test que para los del grupo control, lo cierto es que el análisis estadístico no ha hallado una correlación significativa entre ambos valores tras el período de osteointegración. Esto no concuerda con los resultados presentados en algunos artículos publicados previamente, como, por ejemplo, el de Chen y cols.²¹⁶ del año 2017. En dicho trabajo, los autores colocaron 24 implantes dentales en el fémur de 12 conejos de Nueva Zelanda, y midieron la estabilidad implantaria mediante RFA en el momento de la colocación, a las 2, a las 4, y a las 8 semanas. En cada momento de medición, se fue sacrificando uno de los especímenes, de tal forma que este procedimiento permitía comparar los valores ISQ obtenidos en cada momento con el porcentaje de contacto hueso-implante. El análisis estadístico de los resultados demostró, que tal y como se había planteado en la hipótesis del estudio, existía una correlación estadística positiva entre ambos parámetros.

Sin embargo, abundan mucho más los artículos cuyos resultados están de acuerdo con los obtenidos en este trabajo, concluyendo que no existe una correlación estadísticamente significativa entre los valores de estabilidad implantaria ISQ y el porcentaje de contacto hueso-implante.²¹⁷⁻²²⁰

Por ejemplo, Schiliepake y cols.,²¹⁷ en el año 2006, realizaron un estudio in vivo colocando 80 implantes dentales en las mandíbulas de 10 perros de raza foxhound, con el objetivo de correlacionar los valores ISQ con los datos histomorfométricos. 5 de los animales fueron sacrificados un mes después de la colocación de los implantes, mientras que los otros 5 lo fueron transcurridos 3

meses. En ambos momentos, se tomaron mediciones del ISQ y del BIC. Sin embargo, los autores tuvieron que rechazar la hipótesis del trabajo, ya que no encontraron una correlación estadísticamente significativa entre ISQ y BIC.

Un año después, Ito y cols.,²¹⁸ colocaron 24 implantes dentales en las tibias de 4 minipigs, que posteriormente fueron sacrificados por grupos una semana, dos semanas y cuatro semanas después de la intervención. En el momento de la eutanasia se tomaron mediciones de AFR, y se realizaron cortes histológicos para determinar el BIC de cada implante. Los resultados demostraron que no existía una correlación estadísticamente significativa entre ambos parámetros en ninguno de los momentos de las mediciones.

Por su parte, Park y cols.,²¹⁹ en el año 2011, utilizando el mismo modelo de experimentación que en este trabajo, colocaron 16 implantes en las tibias de 4 conejos de Nueva Zelanda, aunque ellos realizaron el sacrificio de los animales 4 semanas después de la colocación de los implantes. De la misma manera, también tomaron mediciones de AFR en el momento de la cirugía y en el sacrificio, y una vez realizados los cortes histológicos analizaron el porcentaje de contacto hueso-implante. Al igual que el presente estudio, Park y cols. concluyeron que no existía correlación estadísticamente significativa entre ISQ y BIC.

Por último, el estudio de Manresa y cols.,²²⁰ también avala esta ausencia de correlación estadística entre ISQ y BIC, con un estudio experimental realizado en 6 perros Beagle. Para ello colocaron en sus mandíbulas un total de 36 implantes, cuya estabilidad fueron monitorizando mediante la toma de mediciones AFR en el momento de la colocación, y tras 1, 2, 4, 6 y 8 semanas. Los valores ISQ finales fueron comparados con los valores de BIC obtenidos tras el sacrificio, sin embargo, al igual que en este estudio y en los mencionados anteriormente, no se halló una correlación estadísticamente significativa.

En esencia, el análisis de frecuencia de resonancia es una medida física basada en la frecuencia natural de vibración de una estructura (en este caso el implante dentro del hueso) y se relaciona con la rigidez del hueso marginal periimplantario, correlacionándose de manera inversa con el micromovimiento ante la aplicación de carga.¹²⁶ Un mayor BIC no tiene por qué expresar una mayor rigidez, ni una correcta orientación de la matriz ósea en función de la carga, siendo estos dos factores sin embargo críticos en los resultados obtenidos por el RFA.⁸³ Por el contrario, el BIC expresa la cantidad

de hueso que se ha formado en contacto con la superficie del implante, lo que es interpretado con asiduidad como un indicativo numérico del proceso de osteointegración. El hecho de que los porcentajes de BIC se vean aumentados en los implantes del grupo test respecto a los implantes del grupo control, no hace sino demostrar que el estímulo biomecánico recibido mediante la deambulaci3n inmediata, ha provocado que se produzca una osteointegraci3n mejor, o al menos, m1s efectiva. Desde un punto de vista clnico, este descubrimiento es de vital relevancia, ya que sugiere que aquellos implantes que reciban carga durante el proceso de cicatrizaci3n, obtendr1n una mejor osteointegraci3n que aquellos que permanezcan sumergidos siguiendo el protocolo quir1rgico cl1sico de dos fases.

DE LA NEOFORMACI3N OSEA

Por otro lado, el an1lisis histomorfom1trico tambi3n revela que el porcentaje de matriz 3sea inmadura alrededor de los implantes del grupo A es inferior al de los implantes del grupo B de manera estad1sticamente significativa (Grupo A 15,38% \pm 8,84, Grupo B 20,68% \pm 9,53, $p < 0.05$). Este hallazgo se encuentra en sinton1a con el mayor porcentaje de BIC en los implantes sometidos a carga, ya que se demuestra una mayor actividad celular en la aposici3n de matriz 3sea sobre la superficie del implante.

Esto concuerda con los resultados obtenidos por el grupo de estudio de Romanos y cols.^{214,221} en sus estudios publicados en 2002 y 2003, utilizando como modelo experimental monos y perros respectivamente. En el primero de ellos, los resultados de hueso neoformado sobre la superficie de los implantes fue de 76,95% (\pm 11,35) en aquellos que hab1an recibido carga, mientras que aquellos que hab1an permanecido sumergidos solamente alcanzaron un 65,42% (\pm 19,88%) de neoformaci3n 3sea.²¹⁴ En el estudio de 2003, Romanos y cols. colocaron un total de 48 implantes dentales en las mand1bulas de 9 monos, y los dividieron en 3 grupos: sin carga, carga inmediata, y carga diferida. El an1lisis histomorfom1trico revel3 que los implantes que hab1a diferencias estad1sticamente significativas en el grado de mineralizaci3n del hueso periimplantario, entre los implantes que hab1an recibido carga, y los que no.²²¹

Estos resultados tambi3n coinciden con los obtenidos por Moon y cols.,²¹³ en un estudio publicado en el a1o 2008. En esta ocasi3n, los autores

colocaron 5 implantes en la parte izquierda de la mandíbula de 5 perros, y mientras que algunos de los implantes se dejaron sumergidos, y, por lo tanto, sin recibir ningún tipo de carga, otros fueron rehabilitados mediante protocolos de carga inmediata o temprana. Tras el sacrificio de los animales y el correspondiente estudio histológico de las muestras, se comprobó que el porcentaje de hueso neoformado había sido significativamente superior en los implantes con carga inmediata ($73,47\% \pm 12,82$) y carga temprana ($75,00\% \pm 11,25$) que en los implantes que habían permanecido sumergidos ($62,04\% \pm 15,67$).

DE LA DISPOSICIÓN DEL HUESO PERIIMPLANTARIO

Finalmente, en el hueso sometido a carga, se observa una disposición mucho más organizada de las fibras de colágeno, lo que evidencia una maduración ósea más rápida provocada por el estímulo biomecánico.

Este dato coincide con los resultados de los estudios que desarrolló el grupo de Adriano Piatelli¹³²⁻¹³⁵ entre 2005 y 2009.

En el primer artículo, publicado por Traini y cols.¹³² en 2005, estudiaron la orientación de las fibras de colágeno alrededor de implantes de titanio colocados en humanos y sometidos a carga, tal y como se ha realizado en este trabajo. Para llevar a cabo dicho estudio, los autores retiraron 20 implantes osteointegrados, colocados en 10 pacientes 6 meses antes, y mediante el uso de luz polarizada circular y con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido, estudiaron la birrefringencia del hueso, para comparar la orientación que presentaban las fibras de colágeno en el hueso periimplantario y en el hueso alveolar. Al igual que en este estudio, los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la disposición de dichas fibras de colágeno. Mientras que en el hueso alveolar predominaron las fibras longitudinales, en el hueso periimplantario se observó un predominio claro de las fibras orientadas de forma transversal al eje del implante, coincidiendo plenamente con las observaciones de este trabajo. Además, se apreció como las fibras transversales estaban más presentes debajo de las primeras espiras de los implantes, donde la carga actúa con vectores de compresión, mientras en las zonas más alejadas de los implantes, donde la carga actúa como vector de tracción, predominaban las fibras con orientación longitudinal. Esto coincide con estudios previos

realizados en especímenes femorales humanos, que han demostrado que las fibras de colágeno orientadas transversalmente son más frecuentes en las áreas óseas que están sometidas a compresión.^{137,138}

Resultados similares obtuvieron Traini y cols.¹³³ en otro artículo publicado ese mismo año. En esta ocasión, los autores colocaron 10 implantes en la mandíbula edéntula de 10 pacientes, además de un implante adicional en la parte distal de cada mandíbula. A 5 pacientes se les aplicó un protocolo de carga inmediata, colocándose el mismo día de la cirugía una prótesis provisional fija atornillada sobre todos los implantes, mientras que los implantes de los otros 5 pacientes se dejaron sumergidos sin cargar. 6 meses después, se retiraron con una trefina los implantes adicionales, y se hicieron cortes para su análisis histológico. A continuación, mediante el uso de luz polarizada circular y con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido, estudiaron la birrefringencia del hueso, para analizar la orientación de las fibras de colágeno, tanto en los implantes que habían recibido carga, como en los que no. Los resultados demostraron de forma estadísticamente significativa, que en los implantes que habían recibido carga presentaban un predominio de fibras de colágeno transversales, mientras que en los implantes que habían permanecido sin carga durante el proceso de osteointegración, eran mucho más abundantes las fibras de colágeno orientadas en sentido longitudinal al eje del implante.

Al año siguiente, Neugebauer y cols.,¹³⁴ publicaron otro artículo perteneciente a la misma línea de investigación, en el que habían estudiado la organización del hueso alrededor de implantes dentales con carga inmediata, en comparación con la de aquellos que no habían recibido carga. En esta ocasión, el estudio fue realizado en un modelo animal, y para ello, colocaron un total de 85 implantes en la mandíbula de 7 minipigs. Algunos de esos implantes fueron sometidos a un protocolo de carga inmediata, mediante la confección de una prótesis de resina que ferulizaba varios de los implantes, mientras que el resto se dejaron sumergidos y sin carga, lo que permitía que ejercieran las funciones de controles. 3 meses después, los animales fueron sacrificados, y todos los implantes fueron retirados para la realización del estudio histológico. La histomorfometría se realizó utilizando un microscopio óptico con luz polarizada transmitida, conectada a una cámara de video de alta resolución interconectada

a un ordenador. Según los resultados publicados en el estudio, los implantes cargados inmediatamente mostraron un mayor grado de formación y remodelación ósea en comparación con los implantes que habían permanecido libres de carga. Al igual que en el estudio realizado en humanos y publicado un año antes, los implantes con carga inmediata también demostraron una mayor prevalencia de fibras de colágeno orientadas transversalmente en el hueso periimplantario, a diferencia de los implantes sin carga, alrededor de los cuales se observó una mayor cantidad de fibras orientadas en sentido longitudinal.

Por último, el trabajo de Traini y cols¹³⁵. en 200, completa la tetralogía de esta línea de investigación. En esta ocasión, los autores colocaron 25 implantes en 5 minipigs. A cada uno de los ejemplares le colocaron 5 implantes en un lado de la mandíbula, de tal forma que, 4 de ellos fueron cargados de manera inmediata con una restauración fija, mientras que el implante restante se dejó sumergido sin carga. 4 meses después, todos los implantes fueron retirados con una trefina, y se analizó el hueso periimplantario mediante una luz circular polarizada, y un microscopio electrónico de barrido. Los resultados demostraron que no había diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de contacto hueso-implante entre los implantes que habían recibido carga y los que no. Sin embargo, sí que las hubo en la orientación de las fibras de colágeno alrededor de los implantes, así como en el grado de mineralización del hueso periimplantario. Los implantes que habían seguido el protocolo de carga inmediata, mostraron una mayor cantidad de fibras de colágeno dispuestas con una orientación transversal, mientras el grado de mineralización del tejido óseo circundante también resultó ser significativamente superior. Los autores dejan la puerta abierta a futuras investigaciones para analizar de una forma más exhaustiva la relación entre la dirección de la carga recibida y la orientación de las fibras de colágeno.

A destacar que en muchos de los implantes del grupo test de este trabajo, se observan áreas en las que se forman puentes óseos desde la cortical apical hacia el ápice del implante (**Figura.38**).



FIGURA 38. Cortes histológicos de 5 implantes del grupo test, en los que pueden observarse estructuras óseas que asemejan puentes de hueso neoformados desde la cara interna de la cortical de la tibia hasta la superficie de los implantes.

Este fenómeno ya fue descrito por Trindade y cols.²²² y Wiskott y cols.¹⁹² tras sus hallazgos casuales en otros estudios realizados en tibias de conejo. Según estos autores, desde un punto de vista biomecánico, dichas estructuras con forma de puente, podrían no sólo representar una osteointegración mejor y más rápida, sino también constituir un pilar adicional para la estabilización in situ del implante. Pero además, pese a que el análisis de la disposición microscópica de la matriz neoformada, tiene la limitación de resultar exclusivamente cualitativo, se constata una tendencia a la disposición de las fibras de colágeno de manera perpendicular al implante en los test, lo cual tiene sentido desde el punto de vista biomecánico tomando en consideración la posición prácticamente perpendicular al suelo de la tibia del conejo y a la vez a la disposición perpendicular de los implantes respecto al eje mayor de la tibia. Estos hallazgos concuerdan con las histologías mostradas por Tian y cols.²²³ en un estudio reciente, sobre la respuesta mecano adaptativa del hueso alveolar a la sobrecarga del implante durante un estudio experimental en rata. Este concepto constituye la hipótesis principal de este trabajo, y da origen a la “teoría del arbotante óseo”, que fue propuesta anteriormente por los autores en un estudio clínico publicado con anterioridad;¹⁹⁵ el proceso de osteointegración de los implantes dentales sometidos a carga inmediata puede basarse en la aposición

de un hueso orientado a la carga, como los arbotantes de una iglesia gótica, en vez de un hueso pobremente orientado tipo woven bone característico de la osteointegración basada en una carga convencional.

RELEVANCIA CLÍNICA Y APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS

La principal repercusión clínica de estos hallazgos es que se abre la puerta a un cambio en el paradigma de los tiempos de carga de los implantes dentales, que consideraba como convencional el esperar a la consecución de la integración y que tiene su origen en los protocolos establecidos por el profesor Branemark, pero que probablemente respondían a la prudencia y no a la biología. Los resultados de este estudio señalan suficientes ventajas a la funcionalización inmediata, tanto desde el punto de vista de ganancia de BIC, valores de estabilidad biológica superiores y en definitiva la posibilidad de una alineación de la respuesta elástica del hueso con la tensión aplicada.

Estos resultados sugieren, que los protocolos de carga inmediata no solo aportan ventajas como la inmediatez, la reducción de tiempos de tratamiento, o la satisfacción del paciente, si no que, desde el punto de vista de la biología y la fisiología, también puede ser beneficiosos y positivos para la osteointegración del implante, así como para lograr una transmisión de carga más favorable al terreno de soporte.

Basándonos en los resultados de este proyecto de tesis doctoral, la recomendación clínica a la hora de realizar tratamientos con implantes dentales, sería la de adoptar protocolos de carga inmediata siempre que se cumplieran los requisitos necesarios para poder llevarlos a cabo con garantías, ya que sabemos que tanto el BIC como el ISQ y el hueso neoformado sobre los implantes van a ver beneficiados.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Es indudable que existen limitaciones a la hora de inderir los resultados de este estudio realizado en conejo al humano. En primer lugar, la fisiología ósea del conejo, no es idéntica a la fisiología ósea del ser humano, si bien es cierto

que los mecanismos de la mecanotransducción del hueso son semejantes para todos los animales vertebrados.

Por otro lado, tal y como hemos mencionado anteriormente, el hueso tibial, al tratarse de uno de los denominados huesos largos, difiere bastante en su composición macroscópica y microscópica del hueso maxilar humano, ya que está compuesto principalmente de hueso cortical, de alta densidad y bajas celularidad y porosidad, rodeando un canal hueco donde se halla la médula ósea. Sin embargo, los huesos maxilares humanos, aunque en diferente proporción si nos referimos al maxilar superior o a la mandíbula, están compuestos por una capa exterior de hueso cortical que protege un contenido interno de hueso trabecular. Estas diferencias en el modelo de experimentación, hacen que el comportamiento del hueso durante la osteointegración del implante no sea exactamente el mismo, por lo que existen ciertas limitaciones a la hora de establecer similitudes en los patrones de neoformación ósea durante la aplicación de carga sobre los implantes.

Por último, probablemente la mayor limitación del estudio la constituye el método utilizado para la estimulación biomecánica del hueso que rodea a los implantes, ya que puede diferir sustancialmente sobre la biomecánica masticatoria, tanto en magnitud como en dirección de las fuerzas, como probablemente en el modo en el que se produce la transferencia de tensión al hueso marginal periimplantario. Pese a las diferencias, la carrera en la cinta de correr puede ser descrita a nivel biomecánico como dinámica y basada en sucesivas cargas de impacto, precisamente de la misma manera en la que ciertos autores describen a la masticación.¹⁷⁰ Respecto al tiempo de aplicación, hasta 20 minutos diarios, se acerca al tiempo de aplicación diario de las fuerzas masticatorias, que algunos autores consideran de entre 20 - 30 minutos.¹⁷¹ En síntesis, el objetivo de este modelo de estudio fue el de producir un estímulo biomecánico en todo el hueso que rodea los implantes, de la misma manera que la masticación lo induce sobre los huesos maxilares y los implantes que contenga. Sin embargo, no escapa de la mente del autor de esta tesis, que un modelo de masticación puro, se acercaría más a la realidad.

PERSPECTIVAS DE FUTURO Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Después de los resultados obtenidos en este estudio de investigación, el reto que se presenta a continuación es el de mostrar con una mayor evidencia científica, las diferencias en los patrones de disposición de las trabéculas óseas alrededor de los implantes dentales en función del protocolo de carga llevado a cabo. Las limitaciones del modelo experimental empleado en este estudio hacen que no se haya podido observar de manera fehaciente la disposición de las trabéculas óseas, ya que la tibia de conejo es un hueso hueco, con abundante componente cortical, pero carente de hueso trabecular, por lo que resulta imposible observar trabéculas en la histología. Por lo tanto, de cara al futuro, sería interesante realizar más estudios utilizando otro modelo experimental diferente, tal vez el minipig, que nos permita colocar implantes dentales de uso humano, en un hueso mandibular, con componente cortical y trabecular, y con la posibilidad de incorporarle una prótesis fija de carga inmediata.

Por otro lado, también tendría un considerable interés clínico evaluar el efecto que tiene realizar la cirugía en una fase o en dos, en la estabilidad de los implantes y en la disposición de las trabéculas óseas alrededor de ellos. Puesto que este estudio demuestra que la carga inmediata aumenta los valores ISQ y el BIC de los implantes, cabe pensar que la colocación de pilares de cicatrización altos, podrían tener un efecto similar. Aunque los pilares de cicatrización no van a estar en contacto con los dientes antagonistas, y, por lo tanto, no van a recibir carga directa en forma de oclusión, es innegable, que recibirán estímulos biomecánicos por los alimentos que se interpongan durante la masticación, o por la fuerza que la lengua pueda ejercer sobre los pilares cuando el paciente se los toque. Por este motivo, se lanza la hipótesis de que la cirugía en una fase, especialmente con pilares de cicatrización altos, también podría favorecer la osteointegración de los implantes, así como la disposición de las trabéculas óseas orientadas a una transmisión favorable al terreno de soporte en función de la carga.

7. CONCLUSIONES

En concordancia con los resultados obtenidos y teniendo en cuenta las limitaciones propias de ese tipo de estudios, se pueden formular las siguientes conclusiones:

1. La aplicación de carga funcional determina un estímulo biomecánico que influye positivamente sobre el proceso de osteointegración de los implantes.

2. La estabilidad secundaria implantaria es mayor en los implantes sometidos a carga funcional de deambulación que en aquellos que no la han realizado

3. La carga funcional de deambulación favorece el crecimiento óseo vertical por encima de los implantes y la ratio del contacto hueso-implante comparado a aquellos que no han experimentado esa carga

4. Se constata una mayor superficie de hueso neoformado sobre la superficie del implante, con un mayor porcentaje de matriz ósea madura a su alrededor en aquellos implantes sometidos a carga funcional durante el periodo de oseointegración.

5. Las fibras de colágeno y las trabéculas óseas del tejido oseoso muestran una mejor disposición y orientadas a una trasmisión favorable al terreno de soporte en función de la carga.

6. De acuerdo con los resultados obtenidos, las tres hipótesis planteadas de: -El estímulo biomecánico, transmitido al terreno de soporte produce un incremento de su estabilidad secundaria, en comparación con aquellos que no reciban dicho estímulo; - La puesta en función de los implantes por carga de deambulación desde el día de su colocación, acelera su proceso de osteointegración; y La aplicación de carga funcional deambulatoria sobre el hueso periimplantario provoca una reorganización del mismo, deben ser admitidas.

8. 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; 3:81-100.
2. Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec.* 1987; 219:1-9.
3. Gil-Mur J. Avances tecnológicos en implantología oral: hacia los implantes dentales inteligentes. Barcelona: Real Academia Europea de Doctores, 2018.
4. Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. *Instr Course Lect.* 1987; 36:27-48.
5. Martin RB, Burr DB. Structure, Function and adaptation of compact bone. New York: Raven Press, 1989.
6. Clifford R, et al. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 8th Ed. New York: Wiley-Blackwell, 2013.
7. Giraud-Guille MM. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif Tissue Int.* 1988; 42:167-80.
8. Martin RB, Burr DB, Sharkey NA, Fyhrie DP. *Skeletal Tissue Mechanics.* 2nd Ed. New York: Springer, 2015.
9. Lekholm UZG. Patient selection and preparation. In *Tissue integrated prostheses: Osseointegration in clinical dentistry.* Chicago: Quintessence, 1985: 199–209.
10. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006; 11:32-6.
11. Young M. F. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif. Tissue Int.* 2003; 72: 2–4.
12. Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 1993; 8 Suppl 2:483-7.
13. Schonau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism-problems and perspectives in paediatrics. *Horm. Res.* 1997; 48 Suppl 5: 50–9.
14. Lang NP, Araujo M, Karring T. Formación de hueso alveolar. In *Periodoncia clínica e implantología odontológica.* Médica Panamericana. 6th Ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2008:907–39.

15. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 1998; 13:828-38.
16. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks. *J Clin Invest.* 1993; 91:1888-96.
17. Ham AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissues. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1952; 24:701–28.
18. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif. Tissue Int.* 1993; 53 Suppl 1: 102-6.
19. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J. Bone Miner. Res.* 1993;8 Suppl 2:505-10.
20. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 1999; 3:527-38.
21. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998; 17:165-76.
22. Martin RB. Fatigue failure and skeletal evolution. *Int. J. Fatigue.* 2007; 29:1019–23.
23. Ferretti JL. Biomechanical properties of bone. In *Bone densitometry and osteoporosis.* Springer. Berlín Heidelberg:1998.
24. Wolff J. *The Law of Bone Remodeling.* Hirschwald Verlag. Berlin: 1892.
25. Van Oosterwyck H, Duyck J, Vander Sloten J, et al. The influence of bone mechanical properties and implant fixation upon bone loading around oral implants. *Clin Oral Implants Res.* 1998; 9:407-18.
26. Frost HM. A determinant of bone architecture. The minimum effective strain. *Clin Orthop Relat Res.* 1983; 175:286-92.
27. Lanyon LE, Goodship AE, Pye CJ, MacFie JH. Mechanically adaptive bone remodelling. *J Biomech.* 1982; 15:141-54.
28. Rubin CT, Lanyon LE. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J. Bone Joint Surg Am.* 1984; 66:397–402.
29. Bertram JE, Swartz SM. The 'law of bone transformation': a case of crying Wolff? *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1991; 66:245-73.
30. Martin RB. Fatigue damage, remodeling, and the minimization of skeletal weight. *J Theor Biol.* 2003; 220: 271–6.

31. Rodrigo D, Aracil L, Martin C, Sanz M. Diagnosis of implant stability and its impact on implant survival: a prospective case series study. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21: 255–61.
32. Cointry GR, Capozza RF, Ferretti JL, Frost HM. Toward an anthropometric diagnosis of osteopenia and a biochemical diagnosis of osteoporoses. *Medicina (Buenos Aires).* 2003; 63:737-47.
33. Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res.* 1969; 3:211–37.
34. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's Law: The bone modeling problem. *Anat. Rec.* 1990; 226: 403–13.
35. Currey JD. The many adaptations of bone. *J. Biomech.* 2003; 36:1487–95.
36. Burr DB, Martin RB, Schaffler MB, Radin EL. Bone remodeling in response to in vivo fatigue microdamage. *J Biomech.* 1985;18: 189–200.
37. Hazelwood SJ, Martin RB, Rashid MM, Rodrigo JJ. A mechanistic model for internal bone remodeling exhibits different dynamic responses in disuse and overload. *J. Biomech.* 2001; 34:299–308.
38. Akkus O, Polyakova-Akkus A, Adar F, Schaffler MB. Aging of microstructural compartments in human compact bone. *J. Bone Miner. Res.* 2003; 18:1012–9.
39. Burr DB, Miller L, Grynpas M, et al. Tissue mineralization is increased following 1-year treatment with high doses of bisphosphonates in dogs. *Bone.* 2003; 33:960-9.
40. Ruppel ME, Burr DB, Miller LM. Chemical makeup of microdamaged bone differs from undamaged bone. *Bone.* 2006; 39:318-24.
41. Boskey AL, Wright TM, Blank RD. Collagen and bone strength. *J Bone Miner Res.* 1999; 14:330-5.
42. McCalden RW, McGeough JA, Barker MB, Court-Brown CM. Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. *J Bone Joint Surg Am.* 1993; 75:1193-205.
43. Li XJ, Jee WS, Chow SY, Woodbury DM. Adaptation of cancellous bone to aging and immobilization in the rat: a single photon absorptiometry and histomorphometry study. *Anat Rec.* 1990; 227:12-24.
44. Bentolila V, Boyce TM, Fyhrie DP, Drumb R, Skerry TM, Schaffler MB. Intracortical remodeling in adult rat long bones after fatigue loading. *Bone.* 1998; 23:275-81.

45. Marotti G. The osteocyte as a wiring transmission system. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2000; 1:133-6.
46. Frost HM. The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. *J Bone Miner Metab.* 2000; 18: 305-16.
47. Steflik K, McKinney R. Historia de la implantología. In *Implantes endoóseos.* Mosby. Barcelona, 1993.
48. Gómez M, Avila R, Landa S. Evolución histórica de la implantología dental. *Rev Esp Estomatol.* 1988; 1:303–310.
49. Maggiolo, N. *Manual of dental art.* Nancy: Le Seure, 1809.
50. Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. *Tissue-integrated prostheses: Osseointegration in clinical dentistry.* Quintessence. Chicago, 1985.
51. Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983; 50:399-410.
52. Pérez-Pevida E. Análisis biomecánico de la influencia del material de fabricación de implantes dentales en la transferencia de carga al terreno de soporte. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza: Huesca, 2017.
53. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, 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.
54. Schroeder A, Stich H, Straumann F, Sutter F. The accumulation of osteocementum around a dental implant under physical loading. *Rev Mens suisse d'odonto-stomatologie.* 1978; 88:1051–8.
55. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981; 10:387-416.
56. Schenk R, Hjørting-Hansen E, Buser D. Bone integration of implants. *Forum Implantol.* 2006; 1:14–23.
57. Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. Osseointegration--communication of cells. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23:1127-35.
58. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981; 52:155-70.
59. Bahat O, Sullivan RM. Parameters for successful implant integration revisited part I: immediate loading considered in light of the original

- prerequisites for osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010; 12 Suppl 1:2-12.
60. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003; 67:932-49.
 61. Misch CE. Bone classification, training keys to implant success. *Dent Today.* 1989; 8: 39-44.
 62. Li J, Yin X, Huang L, et al. Relationships among Bone Quality, Implant Osseointegration, and Wnt Signaling. *J Dent Res.* 2017; 96:822-31.
 63. Esposito M, Grusovin MG, Willings M, Coulthard P, Worthington HV. The effectiveness of immediate, early, and conventional loading of dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007; 22:893-904.
 64. Esposito M, Grusovin MG, Maghaireh H, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: different times for loading dental implants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; 3:CD003878.
 65. Szmukler-Moncler S, Salama H, Reingewirtz Y, Dubrulle JH. Timing of loading and effect of micromotion on bone-dental implant interface: review of experimental literature. *J Biomed Mater Res.* 1998; 43:192-203.
 66. Brunski JB. Avoid pitfalls of overloading and micromotion of intrasosseous implants. *Dent Implantol Update.* 1993; 4:77-81.
 67. Tehemar SH. Factors affecting heat generation during implant site preparation: a review of biologic observations and future considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14:127-36.
 68. Wilson TG Jr, Miller RJ, Trushkowsky R, Dard M. Tapered Implants in Dentistry: Revitalizing Concepts with Technology: A Review. *Adv Dent Res.* 2016; 28:4-9.
 69. Virk MS, Lieberman JR. Biologic adjuvants for fracture healing. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14:225.
 70. Klein P, Schell H, Streitparth F, Heller M, Kassi JP, Kandziora F, Bragulla H, Haas NP, Duda GN. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res.* 2003; 21:662-9.
 71. Gapski R, Wang HL, Mascarenhas P, Lang NP. Critical review of immediate implant loading. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14:515-27.
 72. Rhinelander FW. Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1974; 105:34-81.

73. Bilhan H, Geckili O, Mumcu E, Bozdog E, Sünbülüoğlu E, Kutay O. Influence of surgical technique, implant shape and diameter on the primary stability in cancellous bone. *J Oral Rehabil.* 2010; 37:900-7.
74. Glauser R, Sennerby L, Meredith N, Rée A, Lundgren A, Gottlow J, Hämmerle CH. Resonance frequency analysis of implants subjected to immediate or early functional occlusal loading. Successful vs. failing implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15:428-34.
75. Farré-Pagés N, Augé-Castro ML, Alaejos-Algarra F, Mareque-Bueno J, Ferrés-Padró E, Hernández-Alfaro F. Relation between bone density and primary implant stability. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011; 16:62-7.
76. Sennerby L, Andersson P, Verrocchi D, Viinamäki R. One-year outcomes of Neoss bimodal implants. A prospective clinical, radiographic, and RFA study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012; 14:313-20.
77. Kim JM, Kim SJ, Han I, Shin SW, Ryu JJ. A comparison of the implant stability among various implant systems: clinical study. *J Adv Prosthodont.* 2009; 1:31-6.
78. de Elío Oliveros J, Del Canto Díaz A, Del Canto Díaz M, Orea CJ, Del Canto Pingarrón M, Calvo JS. Alveolar Bone Density and Width Affect Primary Implant Stability. *J Oral Implantol.* 2020; 46:389-95.
79. Isoda K, Ayukawa Y, Tsukiyama Y, Sogo M, Matsushita Y, Koyano K. Relationship between the bone density estimated by cone-beam computed tomography and the primary stability of dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23:832-6.
80. Marquezan M, Osório A, Sant'Anna E, Souza MM, Maia L. Does bone mineral density influence the primary stability of dental implants? A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23:767-74.
81. Boronat López A, Balaguer Martínez J, Lamas Pelayo J, Carrillo García C, Peñarrocha Diago M. Resonance frequency analysis of dental implant stability during the healing period. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008; 13:244-7.
82. Nedir R, Bischof M, Szmukler-Moncler S, Bernard JP, Samson J. Predicting osseointegration by means of implant primary stability. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15:520-8.
83. Sennerby L, Meredith N. Implant stability measurements using resonance frequency analysis: biological and biomechanical aspects and clinical implications. *Periodontol 2000.* 2008; 47:51-66.
84. Zhou W, Han C, Yunming L, Li D, Song Y, Zhao Y. Is the osseointegration of immediately and delayed loaded implants the same?--comparison of the implant stability during a 3-month healing period in a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20:1360-6.

85. Sim CP, Lang NP. Factors influencing resonance frequency analysis assessed by Osstell mentor during implant tissue integration: I. Instrument positioning, bone structure, implant length. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21:598-604.
86. Barewal RM, Oates TW, Meredith N, Cochran DL. Resonance frequency measurement of implant stability in vivo on implants with a sandblasted and acid-etched surface. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003; 18:641-51.
87. Miyamoto I, Tsuboi Y, Wada E, Suwa H, Iizuka T. Influence of cortical bone thickness and implant length on implant stability at the time of surgery--clinical, prospective, biomechanical, and imaging study. *Bone.* 2005; 37:776-80.
88. Gedrange T, Hietschold V, Mai R, Wolf P, Nicklisch M, Harzer W. An evaluation of resonance frequency analysis for the determination of the primary stability of orthodontic palatal implants. A study in human cadavers. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16:425-31.
89. Nkenke E, Hahn M, Weinzierl K, Radespiel-Tröger M, Neukam FW, Engelke K. Implant stability and histomorphometry: a correlation study in human cadavers using stepped cylinder implants. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14:601-9.
90. Chávarri-Prado D, Brizuela-Velasco A, Diéguez-Pereira M, et al. Influence of cortical bone and implant design in the primary stability of dental implants measured by two different devices of resonance frequency analysis: An *in vitro* study. *J Clin Exp Dent.* 2020; 12:242-8.
91. Degidi M, Daprile G, Piattelli A. Influence of underpreparation on primary stability of implants inserted in poor quality bone sites: an *in vitro* study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 73:1084-8.
92. Díaz-Sánchez RM, Delgado-Muñoz JM, Hita-Iglesias P, Pullen KT, Serrera-Figallo MÁ, Torres-Lagares D. Improvement in the Initial Implant Stability Quotient Through Use of a Modified Surgical Technique. *J Oral Implantol.* 2017; 43:186-93.
93. El-Kholy KE, Elkomy A. Does the Drilling Technique for Implant Site Preparation Enhance Implant Success in Low-Density Bone? A Systematic Review. *Implant Dent.* 2019; 28:500-9.
94. Santamaría-Arrieta G, Brizuela-Velasco A, Fernández-González FJ, et al. Biomechanical evaluation of oversized drilling technique on primary implant stability measured by insertion torque and resonance frequency analysis. *J Clin Exp Dent.* 2016; 8:307-11.
95. Hong HH, Hong A, Yang LY, Chang WY, Huang YF, Lin YT. Implant Stability Quotients of Osteotome Bone Expansion and Conventional

- Drilling Technique for 4.1 mm Diameter Implant at Posterior Mandible. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017; 19:253-60.
96. Tsolaki IN, Tonsekar PP, Najafi B, Drew HJ, Sullivan AJ, Petrov SD. Comparison of Osteotome and Conventional Drilling Techniques for Primary Implant Stability: An In Vitro Study. *J Oral Implantol.* 2016; 42:321-5.
 97. Sadeghi R, Rokn AR, Miremadi A. Comparison of Implant Stability Using Resonance Frequency Analysis: Osteotome Versus Conventional Drilling. *J Dent (Tehran).* 2015; 12:647-54.
 98. Al-Juboori MJ, AbdulRahaman SB. The Effect of Flapless and Full-thickness Flap Techniques on Implant Stability During the Healing Period. *Open Dent J.* 2015; 9:243-9.
 99. Katsoulis J, Avrampou M, Spycher C, Stipic M, Enkling N, Mericske-Stern R. Comparison of implant stability by means of resonance frequency analysis for flapless and conventionally inserted implants. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012; 14:915-23.
 100. Vlahović Z, Mihailović B, Lazić Z, Golubović M. Comparative radiographic and resonance frequency analyses of the peri-implant tissue after dental implants placement using flap and flapless techniques: an experimental study on domestic pigs. *Vojnosanit Pregl.* 2013; 70:586-94.
 101. Shadid RM, Sadaqah NR, Othman SA. Does the Implant Surgical Technique Affect the Primary and/or Secondary Stability of Dental Implants? A Systematic Review. *Int J Dent.* 2014; 1:204838.
 102. Romanos GE, Ciornei G, Jucan A, Malmstrom H, Gupta B. In vitro assessment of primary stability of Straumann® implant designs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014; 16:89-95.
 103. O'Sullivan D, Sennerby L, Meredith N. Measurements comparing the initial stability of five designs of dental implants: a human cadaver study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2000; 2:85-92.
 104. Friberg B, Jisander S, Widmark G, et al. One-year prospective three-center study comparing the outcome of a "soft bone implant" (prototype Mk IV) and the standard Brånemark implant. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003; 5:71-7.
 105. Ostman PO, Hellman M, Wendelhag I, Sennerby L. Resonance frequency analysis measurements of implants at placement surgery. *Int J Prosthodont.* 2006; 19:77-83.
 106. Miyamoto I, Tsuboi Y, Wada E, Suwa H, Iizuka T. Influence of cortical bone thickness and implant length on implant stability at the time of surgery--clinical, prospective, biomechanical, and imaging study. *Bone.* 2005; 37:776-80.

107. Sennerby L. Resonance frequency analysis for implant stability measurements. A review. *Integration diagnostics update*. 2015; 1:1-11.
108. Balleri P, Cozzolino A, Ghelli L, Momicchioli G, Varriale A. Stability measurements of osseointegrated implants using Osstell in partially edentulous jaws after 1 year of loading: a pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2002; 4:128-32.
109. González-García R, Monje F, Moreno-García C. Predictability of the resonance frequency analysis in the survival of dental implants placed in the anterior non-atrophied edentulous mandible. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16:664-9.
110. Bischof M, Nedir R, Szmukler-Moncler S, Bernard JP, Samson J. Implant stability measurement of delayed and immediately loaded implants during healing. *Clin Oral Implants Res*. 2004; 15:529-39.
111. Tözüm TF, Turkyilmaz I, Bal BT. Initial stability of two dental implant systems: influence of buccolingual width and probe orientation on resonance frequency measurements. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2010; 12:194-201.
112. Shalabi MM, Wolke JG, Jansen JA. The effects of implant surface roughness and surgical technique on implant fixation in an in vitro model. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17:172-8.
113. Tabassum A, Meijer GJ, Wolke JG, Jansen JA. Influence of surgical technique and surface roughness on the primary stability of an implant in artificial bone with different cortical thickness: a laboratory study. *Clin Oral Implants Res*. 2010; 21:213-20.
114. Guler AU, Sumer M, Duran I, Sandikci EO, Telcioglu NT. Resonance frequency analysis of 208 Straumann dental implants during the healing period. *J Oral Implantol*. 2013; 39:161-7.
115. Herrero-Climent M, Romero-Ruiz MM, Lázaro-Calvo P, Ríos-Santos JV, Pérez RA, Gil-Mur FJ. Effectiveness of a new dental implant bioactive surface: histological and histomorphometric comparative study in minipigs. *Clin Oral Investig*. 2018; 22:1423-32.
116. Romero-Ruiz MM, Gil-Mur FJ, Ríos-Santos JV, Lázaro-Calvo P, Ríos-Carrasco B, Herrero-Climent M. Influence of a Novel Surface of Bioactive Implants on Osseointegration: A Comparative and Histomorphometric Correlation and Implant Stability Study in Minipigs. *Int J Mol Sci*. 2019; 20:2307.
117. Mateos B, Herrero M, Lázaro P, Mas C, Sanz M. Métodos clínicos para valoración de la estabilidad de la interfase implante-hueso. *Periodoncia*. 2001; 11:323-36.

118. Brizuela-Velasco A, et al. Assessing dental implant stability using acoustic sound analysis | Determinación de la estabilidad de implantes de uso odontológico mediante análisis de armónicos. *Dyna*. 2016; 91:1–6.
119. Turkyilmaz I, Sennerby L, McGlumphy EA, Tözüm TF. Biomechanical aspects of primary implant stability: a human cadaver study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009; 11:113-9.
120. Turkyilmaz I, Tumer C, Ozbek EN, Tözüm TF. Relations between the bone density values from computerized tomography, and implant stability parameters: a clinical study of 230 regular platform implants. *J Clin Periodontol*. 2007; 34:716-22.
121. Schulte W, Lukas D. The Periotest method. *Int Dent J*. 1992; 42:433-40.
122. Schulte W, d'Hoedt B, Lukas D, Maunz M, Steppeler M. Periotest for measuring periodontal characteristics--correlation with periodontal bone loss. *J Periodontal Res*. 1992; 27:184-90.
123. Park JC, Kim HD, Kim SM, Kim MJ, Lee JH. A comparison of implant stability quotients measured using magnetic resonance frequency analysis from two directions: a prospective clinical study during the initial healing period. *Clin Oral Implants Res*. 2010; 21:591-7.
124. 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; 40:221-7.
125. Brizuela-Velasco A, Fernández-González F, Martín Blanco N, Chávarri-Prado D, Chento-Valiente Y, Dehesa-Ibarra B, V. J. Accuracy of Resonance Frequency Analysis by Third Generation Osstell®. *Int. J. Odontostomat*. 2015; 9:489–92.
126. Brizuela-Velasco A, Álvarez-Arenal Á, Gil-Mur FJ, 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; 24:607-11.
127. Oh TJ, Yoon J, Mish C, Wang HL. The cause of early bone loss: myth or science? *J Periodontol*. 2002; 73:322–33.
128. Winet H. The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy. *Bone*. 1996; 19 Suppl 1:39-57.
129. Blenman PR, Carter DR, Beaupré GS. Role of mechanical loading in the progressive ossification of a fracture callus. *J Orthop Res*. 1989; 7:398-407.

130. Hanafusa S, Matsusue Y, Yasunaga T, et al. Biodegradable plate fixation of rabbit femoral shaft osteotomies. A comparative study. *Clin Orthop Relat Res.* 1995; 315:262-71.
131. Kenwright J, Goodship AE. Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1989; 241:36-47.
132. Traini T, Degidi M, Caputi S, Strocchi R, Di Iorio D, Piattelli A. Collagen fiber orientation in human peri-implant bone around immediately loaded and unloaded titanium dental implants. *J Periodontol.* 2005; 76:83-9.
133. Traini T, Degidi M, Strocchi R, Caputi S, Piattelli A. Collagen fiber orientation near dental implants in human bone: do their organization reflect differences in loading? *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 74:538-46.
134. Neugebauer J, Traini T, Thams U, Piattelli A, Zöller JE. Peri-implant bone organization under immediate loading state. Circularly polarized light analyses: a minipig study. *J Periodontol.* 2006; 77:152-60.
135. Traini T, Neugebauer J, Thams U, Zöller JE, Caputi S, Piattelli A. Peri-implant bone organization under immediate loading conditions: collagen fiber orientation and mineral density analyses in the minipig model. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2009; 11:41-51.
136. Farquharson C, Whitehead CC, Loveridge N. Alterations in glycosaminoglycan concentration and sulfation during chondrocyte maturation. *Calcif Tissue Int.* 1994; 54:296-303.
137. Boyde A, Bianco P, Portigliatti Barbos M, Ascenzi A. Collagen orientation in compact bone: I. A new method for the determination of the proportion of collagen parallel to the plane of compact bone sections. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1984; 5:299-307.
138. Portigliatti Barbos M, Bianco P, Ascenzi A. Distribution of osteonic and interstitial components in the human femoral shaft with reference to structure, calcification and mechanical properties. *Acta Anat (Basel).* 1983; 115:178-86.
139. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother.* 2010; 1:94-9.
140. Seo DY, Lee SR, Kim N, Ko KS, Rhee BD, Han J. Humanized animal exercise model for clinical implication. *Pflugers Arch.* 2014; 466:1673-87.
141. Pearce AJ, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.* 2007; 13:1-10.

142. Schimandle JH, Boden SD. Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994; 19:1998-2006.
143. Sedlin ED. A rheologic model for cortical bone. A study of the physical properties of human femoral samples. *Acta Orthop Scand* 1965; Suppl 83:1-77.
144. Nagasawa M, Takano R, Maeda T, Uoshima K. Observation of the bone surrounding an overloaded implant in a novel rat model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013; 28:109-16.
145. Takano R, Nagasawa M, Kitami M, et al. Correlation Between Stress Distributions and Biological Reactions in Bone Surrounding Implants That Support Cantilevers in Supraocclusal Contact in Rats. *Implant Dent*. 2016; 25:204-13.
146. Hou X, Weiler MA, Winger JN, Morris JR, Borke JL. Rat model for studying tissue changes induced by the mechanical environment surrounding loaded titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009; 24:800-7.
147. Vignoletti F, Abrahamsson I. Quality of reporting of experimental research in implant dentistry. Critical aspects in design, outcome assessment and model validation. *J Clin Periodontol*. 2012; 39 Suppl12:6-27.
148. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng*. 1998; 8:1-9.
149. Kuhn JL, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Matthews LS. The limitations of canine trabecular bone as a model for human: a biomechanical study. *J Biomech*. 1989; 22:95-107.
150. Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63:1626-33.
151. Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, Lai YX. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat*. 2015; 16:3:95-104.
152. Stavropoulos A, Cochran D, Obrecht M, Pippenger BE, Dard M. Effect of Osteotomy Preparation on Osseointegration of Immediately Loaded, Tapered Dental Implants. *Adv Dent Res*. 2016; 28:34-41.
153. Liñares A, Mardas N, Dard M, Donos N. Effect of immediate or delayed loading following immediate placement of implants with a modified surface. *Clin Oral Implants Res*. 2011; 22:38-46.
154. Neugebauer J, Iezzi G, Perrotti V, et al. Experimental immediate loading of dental implants in conjunction with grafting procedures. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 91:604-12.

155. Nkenke E, Lehner B, Weinzierl K, et al. Bone contact, growth, and density around immediately loaded implants in the mandible of mini pigs. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14:312-21.
156. Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J.* 2012; 9:111-8.
157. Stübinger S, Dard M. The rabbit as experimental model for research in implant dentistry and related tissue regeneration. *J Invest Surg.* 2013; 26:266-82.
158. Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S. Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 38:356-62.
159. Stadlinger B, Pourmand P, Locher MC, Schulz MC. Systematic review of animal models for the study of implant integration, assessing the influence of material, surface and design. *J Clin Periodontol.* 2012 ;39 Suppl 12:28-36.
160. Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J.* 1998; 18:118-23.
161. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, et al. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol.* 1988; 255:416-21.
162. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010; 16:123-45.
163. Mayer L, Gomes FV, Carlsson L, Gerhardt-Oliveira M. Histologic and Resonance Frequency Analysis of Peri-Implant Bone Healing After Low-Level Laser Therapy: An In Vivo Study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015; 30:1028-35.
164. Mayer L, Gomes FV, de Oliveira MG, de Moraes JF, Carlsson L. Peri-implant osseointegration after low-level laser therapy: micro-computed tomography and resonance frequency analysis in an animal model. *Lasers Med Sci.* 2016; 31:1789-95.
165. Weber JB, Mayer L, Cenci RA, Baraldi CE, Ponzoni D, Gerhardt de Oliveira M. Effect of three different protocols of low-level laser therapy on thyroid hormone production after dental implant placement in an experimental rabbit model. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32:612-7.
166. Dieguez-Pereira M, Brizuela-Velasco A, Chavarri-Prado D, Perez-Pevida E, deLlanos-Lanchares H, Alvarez-Arenal A. The Utility of Implant-Supported Fixed Dental Prosthesis Material for Implant Micromovement

and Peri-implant Bone Microstrain: A Study in Rabbit Tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2020; 35:1132-40.

167. Hexeberg E, Westby J, Hessevik I, Hexeberg S. Effects of endurance training on left ventricular performance: a study in anaesthetized rabbits. *Acta Physiol Scand*. 1995; 154:479-88.
168. Gao L, Wang W, Liu D, Zucker IH. Exercise training normalizes sympathetic outflow by central antioxidant mechanisms in rabbits with pacing-induced chronic heart failure. *Circulation*. 2007; 115:3095-102.
169. Gaustad SE, Rolim N, Wisløff U. A valid and reproducible protocol for testing maximal oxygen uptake in rabbits. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2010; 17:83-8.
170. Misch C. *Implantología contemporánea*. 2nd Ed. Barcelona: Elsevier, 2009.
171. Choy E, Kydd WL. Bite force duration: a diagnostic procedure for mandibular dysfunction. *J Prosthet Dent*. 1988; 60:365-8.
172. Vandamme K, Naert I, Geris L, Vander Sloten J, Puers R, Duyck J. The effect of micro-motion on the tissue response around immediately loaded roughened titanium implants in the rabbit. *Eur J Oral Sci*. 2007; 115:21-9.
173. Han J, Hou J, Zhou G, Wang C, Fan Y. A histological and biomechanical study of bone stress and bone remodeling around immediately loaded implants. *Sci China Life Sci*. 2014; 57:618-26.
174. Hert J. Acceleration of the growth after decrease of load on epiphyseal plates by means of spring distractors. *Folia Morphol*. 1969; 17:194-203.
175. Rubin C, Gross T, Qin YX, Fritton S, Guilak F, McLeod K. Differentiation of the bone-tissue remodeling response to axial and torsional loading in the turkey ulna. *J Bone Joint Surg Am*. 1996; 78:1523-33.
176. Duyck J, Rønold HJ, Van Oosterwyck H, Naert I, Vander Sloten J, Ellingsen JE. The influence of static and dynamic loading on marginal bone reactions around osseointegrated implants: an animal experimental study. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12:207-18.
177. Qin YX, McLeod KJ, Guilak F, Chiang FP, Rubin CT. Correlation of bony ingrowth to the distribution of stress and strain parameters surrounding a porous-coated implant. *J Orthop Res*. 1996; 14:862-70.
178. Tsuge T, Hagiwara Y. Influence of lateral-oblique cyclic loading on abutment screw loosening of internal and external hexagon implants. *Dent Mater J*. 2009; 28:373-81.
179. Kern M, Strub JR, Lü XY. Wear of composite resin veneering materials in a dual-axis chewing simulator. *J Oral Rehabil*. 1999; 26:372-8.

180. Murphy TR. The timing and mechanism of the human masticatory stroke. *Arch Oral Biol.* 1965; 10:981-94.
181. Matsuzaki T, Ayukawa Y, Matsushita Y, et al. Effect of post-osseointegration loading magnitude on the dynamics of peri-implant bone: a finite element analysis and in vivo study. *J Prosthodont Res.* 2019; 63:453-9.
182. Kuroshima S, Nakano T, Ishimoto T, et al. Optimally oriented grooves on dental implants improve bone quality around implants under repetitive mechanical loading. *Acta Biomater.* 2017; 48:433-44.
183. Sasaki M, Kuroshima S, Aoki Y, Inaba N, Sawase T. Ultrastructural alterations of osteocyte morphology via loaded implants in rabbit tibiae. *J Biomech.* 2015; 48:4130-41.
184. Sul YT, Kang BS, Johansson C, Um HS, Park CJ, Albrektsson T. The roles of surface chemistry and topography in the strength and rate of osseointegration of titanium implants in bone. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 89:942-50.
185. Gehrke SA, Aramburu J, Pérez-Díaz L, et al. Can changes in implant macrogeometry accelerate the osseointegration process?: An in vivo experimental biomechanical and histological evaluations. *PLoS One.* 2020; 15:e0233304.
186. Sendyk DI, Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A, Zindel Deboni MC. Does Surgical Experience Influence Implant Survival Rate? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Prosthodont.* 2017; 30:341-7.
187. Brizuela-Velasco A, Álvarez-Arenal Á, Pérez-Pevida E, et al. Logistic Regression Analysis of the Factors Involved in the Failure of Osseointegration and Survival of Dental Implants with an Internal Connection and Machined Collar: A 6-Year Retrospective Cohort Study. *Biomed Res Int.* 2021; 2021:9684511.
188. Marx RE, Shellenberger T, Wimsatt J, Correa P. Severely resorbed mandible: predictable reconstruction with soft tissue matrix expansion (tent pole) grafts. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60:878-88.
189. Daga D, Mehrotra D, Mohammad S, Chandra S, Singh G, Mehrotra D. Tentpole technique for bone regeneration in vertically deficient alveolar ridges: A prospective study. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2018; 8:20-4.
190. Suzuki T, Khouly I, Cho SC, Froum S. Narrow-Diameter Implants: Dual Function as a Tent Pole for Vertical Ridge Augmentation and a Guide for Definitive Implant Position. *Compend Contin Educ Dent.* 2017; 38:230-8.
191. Xiao T, Zhao Y, Luo E, Hu J. "Tent-Pole" for Reconstruction of Large Alveolar Defects: A Case Report. *J Oral Maxillofac Surg.* 2016; 74:55-67.

192. Wiskott HW, Cugnoni J, Scherrer SS, Ammann P, Botsis J, Belser UC. Bone reactions to controlled loading of endosseous implants: a pilot study. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19:1093-102.
193. Pauwels F. *Biomechanics of locomotor apparatus.* New York: Springer,1980.1-228.
194. Liu J, Huang Q, Wang X, et al. Early loading of splinted implants in posterior mandible: Three-year results of a prospective multicenter study. *Clin Oral Implants Res.* 2019; 30:1049-58
195. Brizuela-Velasco A, Chávarri-Prado D. The functional loading of implants increases their stability: A retrospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019; 21:122-9.
196. Brizuela-Velasco A, Fernández-González F, Martín-Blanco N, Chávarri-Prado D, Chento-Valiente Y, Dehesa-Ibarra B. Accuracy of Resonance Frequency Analysis by Third Generation Osstell® *Int J Odontostomat.* 2015; 9:489-92.
197. Sul YT, Jönsson J, Yoon GS, Johansson C. Resonance frequency measurements in vivo and related surface properties of magnesium-incorporated, micropatterned and magnesium-incorporated TiUnite, Osseotite, SLA and TiOblast implants. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20:1146-55.
198. Lee JT, Cho SA. Biomechanical evaluation of laser-etched Ti implant surfaces vs. chemically modified SLA Ti implant surfaces: Removal torque and resonance frequency analysis in rabbit tibias. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016; 61:299-307.
199. Soares PB, Moura CC, Claudino M, Carvalho VF, Rocha FS, Zanetta-Barbosa D. Influence of Implant Surfaces on Osseointegration: A Histomorphometric and Implant Stability Study in Rabbits. *Braz Dent J.* 2015; 26:451-7.
200. Souza FÁ, Furtado TSM, Dayube URC, et al. Comparative in vivo study of alloy titanium implants with two different surfaces: biomechanical and SEM analysis. *Clin Oral Investig.* 2019; 23:4383-97.
201. Lages FS, Douglas-de Oliveira DW, Costa FO. Relationship between implant stability measurements obtained by insertion torque and resonance frequency analysis: A systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018; 20:26-33.
202. Koh JW, Yang JH, Han JS, Lee JB, Kim SH. Biomechanical evaluation of dental implants with different surfaces: Removal torque and resonance frequency analysis in rabbits. *J Adv Prosthodont.* 2009; 1:107-12.

203. 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; 7:261-7.
204. Akoğlan M, Tatli U, Kurtoğlu C, Salimov F, Kürkçü M. Effects of different loading protocols on the secondary stability and peri-implant bone density of the single implants in the posterior maxilla. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017; 19:624-31.
205. Sjöström 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; 34:45-51.
206. Degidi M, Daprile G, Piattelli A, Carinci F. Evaluation of factors influencing resonance frequency analysis values, at insertion surgery, of implants placed in sinus-augmented and nongrafted sites. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2007; 9:144-9.
207. Jahangiri L, Hessamfar R, Ricci JL. Partial generation of periodontal ligament on endosseous dental implants in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16:396-401.
208. Cano-Sánchez J, Campo-Trapero J, Gonzalo-Lafuente JC, Moreno-López LA, Bascones-Martínez A. Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005; 10 Suppl 1:74-87.
209. Jensen LN, Jensen JS, Gotfredsen K. A method for histological preparation of undecalcified bone sections containing acrylic bone cement. *Biotech Histochem.* 1991; 1:82-6.
210. Tamura T, Fukase Y, Goke E, et al. Three-dimensional evaluation for augmented bone using guided bone regeneration. *J Periodontal Res.* 2005; 40:269-76.
211. Jing XL, Farberg AS, Monson LA, Donneys A, Tchanque-Fossuo CN, Buchman SR. Radiomorphometric quantitative analysis of vasculature utilizing micro-computed tomography and vessel perfusion in the murine mandible. *Craniomaxillofac Trauma Reconstr.* 2012; 5:223-30.
212. Duvall CL, Taylor WR, Weiss D, Guldberg RE. Quantitative microcomputed tomography analysis of collateral vessel development after ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287:302-10.
213. Moon SY, Kim SG, Lim SC, Ong JL. Histologic and histomorphometric evaluation of early and immediately loaded implants in the dog mandible. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 86:1122-7.
214. Romanos GE, Toh CG, Siar CH, Wicht H, Yacoob H, Nentwig GH. Bone-implant interface around titanium implants under different loading

conditions: a histomorphometrical analysis in the *Macaca fascicularis* monkey. *J Periodontol.* 2003; 74:1483-90.

215. Podaropoulos L, Veis AA, Trisi P, Papadimitriou S, Alexandridis C, Kalyvas D. Bone reactions around dental implants subjected to progressive static load: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2016; 27:910-7.
216. Chen HH, Lai WY, Chee TJ, Chan YH, Feng SW. Monitoring the Changes of Material Properties at Bone-Implant Interface during the Healing Process In Vivo: A Viscoelastic Investigation. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:1945607.
217. Schliephake H, Sewing A, Aref A. Resonance frequency measurements of implant stability in the dog mandible: experimental comparison with histomorphometric data. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35:941-6.
218. Ito Y, Sato D, Yoneda S, Ito D, Kondo H, Kasugai S. Relevance of resonance frequency analysis to evaluate dental implant stability: simulation and histomorphometrical animal experiments. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19:9-14.
219. Park IP, Kim SK, Lee SJ, Lee JH. The relationship between initial implant stability quotient values and bone-to-implant contact ratio in the rabbit tibia. *J Adv Prosthodont.* 2011; 3:76-80.
220. Manresa C, Bosch M, Echeverría JJ. The comparison between implant stability quotient and bone-implant contact revisited: an experiment in Beagle dog. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25:1213-21.
221. Romanos GE, Toh CG, Siar CH, Swaminathan D. Histologic and histomorphometric evaluation of peri-implant bone subjected to immediate loading: an experimental study with *Macaca fascicularis*. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002; 7:44-51.
222. Trindade R, Albrektsson T, Galli S, Prgomet Z, Tengvall P, Wennerberg A. Osseointegration and foreign body reaction: Titanium implants activate the immune system and suppress bone resorption during the first 4 weeks after implantation. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018; 20:82-91.
223. Tian Y, Li Z, Chen J, et al. Mechano-adaptive Responses of Alveolar Bone to Implant Hyper-loading in a pre-clinical in vivo model. *Clin Oral Implants Res.* 2020; 31:1159-72.

ANEXOS

1. DIPLOMAS Y CERTIFICADOS DE CAPACITACIÓN PARA LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL



Diploma del Curso

Función de Cuidado de los Animales: Función A

Animalaria Formación y Gestión, S.L. informa que

David Chávarri Prado

72751701X

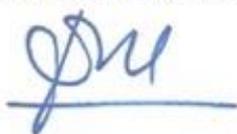
Ha superado el curso de 34 horas de duración para la obtención de la Función A de experimentación animal, para todas las especies del Anexo II, celebrado de forma no presencial 15 de Enero al 12 de Marzo de 2018 y que ha sido reconocido por la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Comunidad de Madrid con fecha 4 de Abril de 2016 (Referencia 10/069861.9/16 de Fecha 08/04/2016).

Y para que conste se expide en Madrid a 12 de Marzo de 2018.

Los Directores del Curso

Dr. José M^o Orellana Muriana

Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura



De acuerdo con la Orden Ministerial ECC 566/2015 de 1 de Abril de 2015

CIF B84624535
C/ Los Fresnos 14
28720 Bustarviejo (Madrid)

Tel. 699921930
animalaria@animalaria.org

Diploma del Curso

Función de Eutanasia de los Animales: Función B

Animalaria Formación y Gestión, S.L. informa que

David Chávarri Prado

72751701X

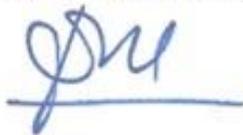
Ha superado el curso de 24 horas de duración para la obtención de la Función B de experimentación animal, para todas las especies del Anexo II, celebrado de forma no presencial del 15 de Enero al 12 de Marzo de 2018 y que ha sido reconocido por la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Comunidad de Madrid con fecha 4 de Abril de 2016 (Referencia 10/069861.9/16 de Fecha 08/04/2016).

Y para que conste se expide en Madrid a 12 de Marzo de 2018.

Los Directores del Curso

Dr. José M^o Orellana Muriana

Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura



De acuerdo con la Orden Ministerial ECC 566/2015 de 1 de Abril de 2015

Diploma del Curso

Función de Realización de los Procedimientos: Función C

Animalaria Formación y Gestión, S.L. informa que

David Chávarri Prado

72751701X

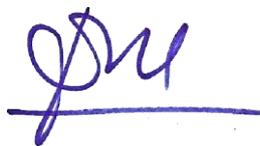
Ha superado el curso de 57 horas de duración para la obtención de la Función C de experimentación animal, para todas las especies del Anexo II, celebrado de forma no presencial del 15 de Enero al 12 de Marzo de 2018 y que ha sido reconocido por la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Comunidad de Madrid con fecha 4 de Abril de 2016 (Referencia 10/ 069861.9/ 16 de Fecha 08/ 04/ 2016).

Y para que conste se expide en Madrid a 12 de Marzo de 2018.

Los Directores del Curso

Dr. José M^a Orellana Muriana

Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura



De acuerdo con la Orden Ministerial ECC 566/2015 de 1 de Abril de 2015

CIF B84624535
C/ Los Fresnos 14

Tel. 699921930
animalaria@animalaria.org

28720 Bustarviejo (Madrid)

Diploma del Curso Puente
Función de Diseño de los Proyectos y Procedimientos
Función D

Dirigido al personal con la Función C

Animalaria Formación y Gestión, S.L. informa que

David Chávarri Prado
72751701X

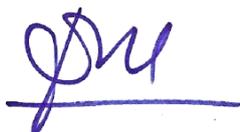
Ha superado el curso de 50 horas de duración para la obtención de la Función D de experimentación animal, para todas las especies del Anexo II, celebrado de forma no presencial del 2 de Abril al 28 de Mayo de 2018 y que ha sido reconocido por la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Comunidad de Madrid con fecha 4 de Abril de 2016 (Referencia 10/ 069861.9/ 16 de Fecha 08/ 04/ 2016).

Y para que conste se expide en Madrid a 28 de Mayo de 2018.

Los Directores del Curso

Dr. José M^a Orellana Muriana

Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura



De acuerdo con la Orden Ministerial ECC 566/2015 de 1 de Abril de 2015



Comunidad de Madrid

Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo

D./Dña. DAVID CAHAVARRI PRADO, con DNI/NIE 72751701X ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de:

CUIDADO DE LOS ANIMALES

REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

en los siguientes grupos de especies animales:

ROEDORES

Nº de certificado: CAP-1595-18

ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO

Dirección General de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Comunidad de Madrid

El reconocimiento de la capacitación para la realización de las funciones relacionadas en este certificado surtirá efecto en todo el territorio nacional.

Fecha, 11 de septiembre de 2018

Sello

EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN

(P.D.F Resolución de 15 de junio de 2018)

EL SUBDIRECTOR GENERAL DE PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA Y BIENESTAR ANIMAL.

Fdo: Jesús Carpintero Hervás



Comunidad de Madrid

Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo

D./Dña. DAVID CAHAVARRI PRADO, con DNI/NIE 72751701X ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de:

DISEÑO DE LOS PROYECTOS Y PROCEDIMIENTOS

en los siguientes grupos de especies animales:

SIN LIMITACIÓN DE ESPECIES

Nº de certificado: CAP-1596-18

ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO

Dirección General de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Comunidad de Madrid

El reconocimiento de la capacitación para la realización de las funciones relacionadas en este certificado surtirá efecto en todo el territorio nacional.

Fecha, 11 de septiembre de 2018

Sello

EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN

(P.D.F Resolución de 15 de junio de 2018)

EL SUBDIRECTOR GENERAL DE PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA Y BIENESTAR ANIMAL.

Fdo: Jesús Carpintero Hervás

2. RESOLUCIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS PARA LA REALIZACIÓN DE UN ESTUDIO PILOTO

GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

CONSEJERÍA DE DESARROLLO RURAL Y RECURSOS NATURALES

RESOLUCIÓN de 23 de abril de 2018, de la Consejería de Desarrollo Rural y Recursos Naturales, sobre autorización de proyectos de investigación que utilicen animales de experimentación.

PROAE 07/2018

Servicio de Sanidad y Producción Animal

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

CIF: Q33180011

RESOLUCIÓN

ANTECEDENTES DE HECHO

Primero.- Con fecha 21 de febrero de 2018, **JOSE RAMÓN OBESO SUÁREZ** en representación del **BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, presentó solicitud de autorización para la utilización de animales en el siguiente proyecto de experimentación **"INFLUENCIA DE LA CARGA EN LA DISPOSICIÓN DE LAS TRABÉCULAS ÓSEAS ALREDEDOR DE IMPLANTES (ESTUDIO PILOTO)"**, constando como investigador principal D. **ÁNGEL ÁLVAREZ ARENAL** y como investigador responsable de los procedimientos con animales D. **AGUSTÍN BREA PASTOR**.

Junto con la solicitud, aporta la propuesta del proyecto, el resumen no técnico e informe del comité ético y de evaluación del proyecto por el órgano habilitado.

Segundo.- El lugar donde se desarrollará el proyecto se encuentra autorizado como establecimiento usuario y está inscrito en el Registro de Explotaciones Ganaderas con el número **ES330440003591**.

Tercero.- Con fecha **20 de febrero de 2018**, el Comité de Ética del centro emite un informe favorable, conforme al RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Cuarto.- Con fecha **20 de febrero de 2018**, el Comité Ético de Experimentación animal de **LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, órgano habilitado, emite informe de evaluación favorable del proyecto, indicando que el proyecto cuyos datos y evaluación se proporcionan han sido evaluados con un nivel de detalle apropiados y que la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los requisitos especificados en el artículo 34 del RD 53/2013 de 1 de febrero y que, tanto el investigador responsable del proyecto como las personas encargadas de la realización del mismo tienen capacitación para ello.

Quinto.- Una vez revisada la solicitud y la documentación presentada, la Jefa del Servicio de Sanidad y Producción Animal elevó con fecha **20 de abril de 2018** una propuesta de resolución de autorización de proyectos de investigación que utilicen animales de experimentación.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Primero.- El artículo 25 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, dispone:

"2. Los procedimientos solo se podrán realizar si están incluidos dentro del marco de un proyecto autorizado de acuerdo con la sección 2ª de este capítulo.

3. Los procedimientos deberán realizarse de forma que se evite a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios.

4. Los procedimientos se realizarán en centros usuarios autorizados, salvo autorización del órgano competente, previa justificación científica de la necesidad o conveniencia de que se realicen fuera de dichos centros.

5. Los procedimientos únicamente podrán ser realizados por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 bajo supervisión responsable".

Asimismo, el artículo 31 del citado Real Decreto, situado en su sección 2ª, regula la tipología de proyectos con arreglo a la siguiente clasificación:

"1. Proyectos de tipo I: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las tres circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.
- c) Se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.

Los proyectos tipo I podrán ser tramitados por un procedimiento simplificado y no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

2. Proyectos de tipo II: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.

Los proyectos tipo II quedarán sujetos al procedimiento de autorización y podrán no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

3. Proyectos de tipo III: Los proyectos diferentes de los tipos I o II. Sin perjuicio de las autorizaciones adicionales a las que puedan estar condicionados determinados proyectos, todos los proyectos tipo III quedarán sujetos al procedimiento de autorización y serán sometidos posteriormente a una evaluación retrospectiva".

Segundo.- El proyecto para el que se solicita la autorización ha de ser considerado dentro del **tipo II**, puesto que implica procedimientos clasificados como "moderados": **CIRUGÍA PARA COLOCACIÓN DE IMPLANTE TIBIAL y EJERCICIO EN TAPIZ RODANTE**, y no utiliza primates.

El establecimiento donde se desarrollará tiene la correspondiente autorización.

Los informes emitidos al respecto son favorables, por lo que, cumpliendo con los requisitos previstos, ha de procederse a su autorización y deberá someterse a **evaluación retrospectiva** tras la finalización del proyecto prevista en **noviembre de 2018**.

RESUELVO

Primero.- Autorizar al **BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, el proyecto denominado: **"INFLUENCIA DE LA CARGA EN LA DISPOSICIÓN DE LAS TRABÉCULAS ÓSEAS ALREDEDOR DE IMPLANTES (ESTUDIO PILOTO)"** en el que consta como investigador principal D. **ÁNGEL ÁLVAREZ ARENAL** y como investigador responsable de los

procedimientos con animales D. **AGUSTÍN BREA PASTOR**.

Esta autorización tendrá una validez que se corresponderá con la duración prevista en su memoria, con un máximo de cinco años, siempre y cuando no se produzca una modificación relevante en dicho proyecto, en cuyo caso sería necesario efectuar una nueva solicitud de autorización a la autoridad competente.

Segundo.- Asignar el código de autorización: **PROAE 07/2018**

Tercero.- Ordenar la notificación de la presente Resolución al interesado.

Cuarto.- La presente resolución pone fin a la vía administrativa y contra ella cabe interponer recurso contencioso-administrativo ante la Sala de lo Contencioso-Administrativo del Tribunal Superior de Justicia del Principado de Asturias en el plazo de dos meses, contados desde el día siguiente al de su notificación, de acuerdo con lo establecido en los artículos 10 y 46 de la Ley 29/1998, de 13 de julio, reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa, sin perjuicio de la posibilidad de previa interposición del recurso potestativo de reposición ante el mismo órgano que dictó el acto, en el plazo de un mes contado desde el día siguiente al de su notificación, no pudiendo simultanearse ambos recursos, conforme a lo establecido en el artículo 28 de la Ley del Principado de Asturias 2/1995, de 13 de marzo, sobre Régimen Jurídico de la Administración y en el artículo 123 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas. No obstante, los interesados podrán ejercitar, en su caso, cualquier otro recurso que estimen procedente.

 LA CONSEJERA
M. Jesús Álvarez González
María Jesús Álvarez González

3. RESOLUCIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS PARA LA REALIZACIÓN DEL ESTUDIO COMPLETO

GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

CONSEJERÍA DE DESARROLLO RURAL Y RECURSOS NATURALES

RESOLUCIÓN de 2 de mayo de 2019, de la Consejería de Desarrollo Rural y Recursos Naturales, sobre autorización de proyectos de investigación que utilicen animales de experimentación.

PROAE 18/2019

Servicio de Sanidad y Producción Animal

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

CIF: Q3318001I

RESOLUCIÓN

ANTECEDENTES DE HECHO

Primero.- Con fecha 12 de marzo de 2019, **JOSE RAMÓN OBESO SUÁREZ** en representación del **BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, presentó solicitud de autorización para la utilización de animales en el siguiente proyecto de experimentación **"INFLUENCIA DE LA CARGA EN LA DISPOSICIÓN DE LAS TRABÉCULAS ÓSEAS ALREDEDOR DE IMPLANTES (AMPLIACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL)"**, constandingo como investigador principal D. **ÁNGEL ÁLVAREZ ARENAL** y como investigador responsable de los procedimientos con animales D. **DAVID CHÁVARRI PRADO**.

Junto con la solicitud, aporta la propuesta del proyecto, el resumen no técnico e informe del comité ético y de evaluación del proyecto por el órgano habilitado.

Segundo.- El lugar donde se desarrollará el proyecto se encuentra autorizado como establecimiento usuario y está inscrito en el Registro de Explotaciones Ganaderas con el número **ES330440003591**.

Tercero.- Con fecha **12 de marzo de 2019**, el Comité de Ética del centro emite un informe favorable, conforme al RD 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Cuarto.- Con fecha **12 de marzo de 2019**, el Comité Ético de Experimentación animal de **LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, órgano habilitado, emite informe de evaluación favorable del proyecto, indicando que el proyecto cuyos datos y evaluación se proporcionan han sido evaluados con un nivel de detalle apropiados y que la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los requisitos especificados en el artículo 34 del RD 53/2013 de 1 de febrero y que, tanto el investigador responsable del proyecto como las personas encargadas de la realización del mismo tienen capacitación para ello.

Quinto.- Una vez revisada la solicitud y la documentación presentada, la Jefa del Servicio de Sanidad y Producción Animal elevó con fecha **29 de abril de 2019** una propuesta de resolución de autorización de proyectos de investigación que utilicen animales de experimentación.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Primero.- El artículo 25 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, dispone:

"2. Los procedimientos solo se podrán realizar si están incluidos dentro del marco de un proyecto autorizado de acuerdo con la sección 2ª de este capítulo.

3. Los procedimientos deberán realizarse de forma que se evite a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios.

4. Los procedimientos se realizarán en centros usuarios autorizados, salvo autorización del órgano competente, previa justificación científica de la necesidad o conveniencia de que se realicen fuera de dichos centros.

5. Los procedimientos únicamente podrán ser realizados por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 bajo supervisión responsable”.

Asimismo, el artículo 31 del citado Real Decreto, situado en su sección 2ª, regula la tipología de proyectos con arreglo a la siguiente clasificación:

“1. Proyectos de tipo I: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las tres circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.
- c) Se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.

Los proyectos tipo I podrán ser tramitados por un procedimiento simplificado y no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

2. Proyectos de tipo II: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.

Los proyectos tipo II quedarán sujetos al procedimiento de autorización y podrán no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

3. Proyectos de tipo III: Los proyectos diferentes de los tipos I o II. Sin perjuicio de las autorizaciones adicionales a las que puedan estar condicionados determinados proyectos, todos los proyectos tipo III quedarán sujetos al procedimiento de autorización y serán sometidos posteriormente a una evaluación retrospectiva”.

Segundo.- El proyecto para el que se solicita la autorización ha de ser considerado dentro del **tipo II**, puesto que implica procedimientos clasificados como **“moderados”**: **CIRUGÍA PARA COLOCACIÓN DE IMPLANTE TIBIAL Y EJERCICIO EN TAPIZ RODANTE** y no utiliza primates.

El establecimiento donde se desarrollará tiene la correspondiente autorización.

Los informes emitidos al respecto son favorables, por lo que, cumpliendo con los requisitos previstos, ha de procederse a su autorización y **no debe someterse a evaluación retrospectiva**.

RESUELVO

Primero.- Autorizar al **BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, el proyecto denominado: **“INFLUENCIA DE LA CARGA EN LA DISPOSICIÓN DE LAS TRABÉCULAS ÓSEAS ALREDEDOR DE IMPLANTES (AMPLIACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL)”** en el que consta como investigador principal D. **ÁNGEL ÁLVAREZ ARENAL** y como investigador

GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS
CONSEJERÍA DE DESARROLLO RURAL Y RECURSOS NATURALES

responsable de los procedimientos con animales D. **DAVID CHÁVARRI PRADO**.

Esta autorización tendrá una validez que se corresponderá con la duración prevista en su memoria, con un máximo de cinco años, siempre y cuando no se produzca una modificación relevante en dicho proyecto, en cuyo caso sería necesario efectuar una nueva solicitud de autorización a la autoridad competente.

Segundo.- Asignar el código de autorización: **PROAE 18/2019**

Tercero.- Ordenar la notificación de la presente Resolución al interesado.

Cuarto.- La presente resolución pone fin a la vía administrativa y contra ella cabe interponer recurso contencioso-administrativo ante la Sala de lo Contencioso-Administrativo del Tribunal Superior de Justicia del Principado de Asturias en el plazo de dos meses, contados desde el día siguiente al de su notificación, de acuerdo con lo establecido en los artículos 10 y 46 de la Ley 29/1998, de 13 de Julio, reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa, sin perjuicio de la posibilidad de previa interposición del recurso potestativo de reposición ante el mismo órgano que dictó el acto, en el plazo de un mes contado desde el día siguiente al de su notificación, no pudiendo simultanearse ambos recursos, conforme a lo establecido en el artículo 28 de la Ley del Principado de Asturias 2/1995, de 13 de marzo, sobre Régimen Jurídico de la Administración y en el artículo 123 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas. No obstante, los interesados podrán ejercitar, en su caso, cualquier otro recurso que estimen procedente.

LA CONSEJERA



María Jesús Álvarez González

4. INDICIOS DE CALIDAD DE LA TESIS
COMUNICACIÓN ORAL PRESENTADA EN CONGRESO SEPES
BILBAO (2016)



13, 14 y 15 de Octubre | Palacio Euskalduna

Otorga el presente certificado a:

D./ Dña. DAVID CHÁVARRI PRADO

como autor/a de la Comunicación Oral de Investigación titulada:

OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO DE IMPLANTOPRÓTESIS PARA EL ESTUDIO DE LA SOBRECARGA OCLUSAL COMO FACTOR CAUSAL DE PÉRDIDA ÓSEA MARGINAL EN IMPLANTES OSTEOINTEGRADOS EN RATA

y realizada en colaboración con

ARITZA BRIZUELA VELASCO, ANTONIO JIMÉNEZ GARRUDO, MARKEL DIÉGUEZ PEREIRA, OIER MONTALBÁN VADILLO, IKER BELLANCO DE LA PINTA.

Presentada en la 46º REUNIÓN ANUAL de SEPES, celebrada en Bilbao los días 13, 14 y 15 de Octubre 2016.

Y para que así conste se expide el presente Certificado en Bilbao, a 15 de Octubre 2016.

Dra. Eva Berroeta
Pta del comité organizador SEPES BILBAO 2016

Dr. Juan Ignacio Rodríguez Ruiz
Presidente de SEPES



ORIGINAL ARTICLE

The functional loading of implants increases their stability: A retrospective clinical study

Aritz Brizuela-Velasco DDS, PhD¹ | David Chávarri-Prado DDS, MSc²

¹Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

²Department of Stomatology I, Faculty of Medicine and Dentistry, University of the Basque Country, Leioa, Spain

Correspondence

David Chávarri-Prado, Department of Stomatology I, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Basque Country, Barrio de Sarriena s/n 48940 Leioa, Vizcaya, Spain.
Email: davidchavarri@hotmail.com

Abstract

Purpose: To assess the difference in the evolution of implant stability values, determined by resonance frequency analysis (RFA), between two groups of implants subjected to two different loading protocols: immediate and delayed.

Materials and Methods: A retrospective clinical study was conducted, including a total of 93 implants placed in 38 patients. All implants corresponded to one of two models of the Klockner Implant System (Essential Cone and Vega) and were divided into two groups according to the loading protocol adopted: delayed loading in group A (>10 weeks) and immediate loading in group B (<48 hours). Implant stability was measured four times throughout the study period with a Penguin RFA device: implant placement (T0), definitive loading (T1), 6 months after loading (T2), and 12 months after loading (T3).

Results: Implant stability quotient (ISQ) values showed a statistically significant increase in both groups after loading. In group A, the greatest increase in stability occurred between T1 and T2, whereas in group B, the greatest increase occurred between T0 and T1, coinciding in both cases with the period in which the implants were subjected to prosthetic loading.

Conclusions: The functional loading of implants increases their stability, as measured in ISQ values by RFA. Increases in ISQ values are greater during the months immediately following loading, which shows that immediate or early loading protocols are not only possible but can also be beneficial.

KEYWORDS

bone-implant interface, immediate loading, implant stability

1 | INTRODUCTION

Bone, as the supporting tissue of vertebrates, has adapted over millions of years of evolution to the weight determined by the gravitational pull of the Earth and the function of movement allowed by it. The classic studies of Galileo Galilei (*Animalium Motibus*) and Wolff have theorized about the influence of stress and strain in the form and structure of bones.¹

The mechanobiology of bones is closely related to the function of a bone cell, the osteocyte, and its ability to communicate with other bone cell lines by certain cytokines. In sum, the osteocyte is activated by changes in the flow of canalicular fluid within which its cytoplasmic processes are contained, in response to deformations of the extracellular bone matrix resulting from loading. This activation promotes the release of different mediators (prostaglandin E2, osteoprotegerin,

sclerostin, and nitric oxide) that can generate different anabolic or catabolic responses by inhibiting or stimulating the function of other bone cells: osteoblasts and osteoclasts.²

In short, beyond homeostatic targets, bone remodeling is activated depending on loading, either by default or in response to excess microdamage, fulfilling a double function: weight control, by eliminating areas of bone without loading stimulation, and repair of accumulated damages, preventing stress fractures.³ Bone remodeling is a coupled process of resorption and apposition characterized by the role of bone multicellular units (osteoclastic resorption front, osteoblastic apposition front, and compartment containing blood vessels and pericytes).⁴

The jaws are not unrelated to this behavior. The load supported by the jaws results from chewing. Chewing forces, as a vector unit, are described based on their magnitude and direction. Most authors

argue that chewing mainly imposes vertical forces on teeth and generates horizontal forces due to the horizontal movement of the mandible and the inclination of tooth cusps.⁵ In this sense, several authors have experimentally studied the maximum bite force, having found values between 200 and 2440 N for the axial component and 30 N for the lateral component.^{6,7}

Dental implants and the crowns attached to them are an effective and predictable method for functional and aesthetic restoration after tooth loss. Several studies have shown that implants support forces of direction and mostly magnitude equal to or even greater than those supported by teeth.^{8,9} However, an identical biomechanical behavior of tooth and implant should not be expected. The tooth has a precise mechanoreception system with a passive detection threshold of 2 g and an active one of 20 μm , compared to an implant with 100 g and 50 μm , respectively.¹⁰ Tooth mechanoreception is based, although not exclusively, on the mechanoreceptors of the periodontal ligament, which is a specialized connective tissue functioning as a true shock absorber of the stress transferred by masticatory forces.¹¹ For its part, the implant lacks a ligament, and its direct connection with bone is the result of a process of osseointegration.

Osseointegration can be considered a type of direct or primary healing, in which a woven bone scaffold, closely associated with an expanding vascular network, invades the granulation tissue derived from the initial blood clot. For this reason, it has been considered that the process shares many prerequisites with primary fracture healing, such as fitting (anatomical reduction), primary stability (stable fixation), and adequate loading during the healing period.¹¹ Indeed, several animal model studies have determined that the lack of mechanical stabilization of the edges of a bone fracture can lead to healing failure, characterized by the interposition of fibrous tissue, which is caused by the lack of stability affecting the neovascularization process.¹² Most likely, according to this reason, the original Brånemark protocol required that the implant should not be loaded immediately after inserting the implant into the jaw, waiting until the 6th month of integration. Although this time has been reduced until the 8th week with surface modifications or even the 6th week with the advent of osteoinductive surfaces, in practice, the same process continues to be observed in most rehabilitation.¹³ However, science has shown that other procedures that do not respect this fact can also be successful, such as immediate loading; that is, the one in which the implant and implant-supported prosthesis are immediately placed in function¹⁴ or even immediate loading of single units after extraction.¹⁵ The theory that mechanical instability and inadequate loading affect bone healing is not proven wrong by these studies, as they only show that the process can be successful under more demanding mechanical conditions, as long as they do not exceed the biological threshold. In addition, although these procedures may seem riskier, they may hide a benefit: conventional loading protocols, in which the prosthesis is placed several months after implant placement when it is already osseointegrated, force bone to undergo subsequent remodeling, reorienting the bone according to the load supported, based on inflammatory processes.¹⁶

This evolution of the osseointegration of an implant, beginning with its insertion into the bone and given that its primary stabilization is exclusively mechanical, moving through the secondary stabilization experienced after the apposition of bone on its surface, can be

monitored in a noninvasive way by means of resonance frequency analysis (RFA). The resonance frequency of a certain structure is an intrinsic physical property that has a correlation with the elastic properties and the mass of that structure. There are different devices on the market, among which the Penguin RFA (Integration Diagnostics Sweden AB, Göteborg, Sweden) stands out. This device is based on the placement of a transducer screwed to the implant connection, which is stimulated by electromechanical loading. It takes advantage of a physical principle that determines that when a structure is mechanically stimulated with a force whose period of vibration approaches its natural frequency, it will enter into vibration. The device returns a value expressed as a quotient, in which the value 0 would be the maximum vibration and 100 the lowest possible¹⁷ and which is called the implant stability quotient (ISQ). The ISQ has been demonstrated to be a valid clinical value to monitor the evolution of implant stability, expressing the rigidity of the contact with peri-implant bone¹⁸ and having a direct linear correlation with implant micromotion before functional loading.¹⁹ It can be explained that as the process of integration of the implant takes place, bone apposition on the titanium surface will change the contour of the implant and thus its natural frequency of vibration. Not only that but also the histological modifications (the shift from woven bone to lamellar bone—a result of the adaptation to load) should also be taken as changes in vibration and ultimately in ISQ values, on the basis that they will necessarily determine modifications of the elastic response or even bone mass around the implant.

The objectives of this retrospective clinical study are to assess and compare changes in primary and secondary stabilization between implants subjected to two types of loading, immediate and delayed, using RFA.

This study also aims to examine the evolution of implant stability in the study sample, using the same method of analysis, after prosthetic loading of the definitive crown, which is evidenced by a computerized occlusal analysis.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study design and patient data

The study was designed as a retrospective clinical study, based on data collected on the rehabilitated implants in a private dental clinic (Reyes de Navarra, Vitoria-Gasteiz, Spain) during one full calendar year (2016), always performed by the same operator (surgery and rehabilitation). The follow-up period was 12 months after loading for all cases. This is an observational, noninterventionist study, so it did not require acceptance by any ethics committee.

2.2 | Inclusion criteria

- Medically healthy adult (American Society of Anesthesiologists classification I-II)
- Age ≥ 20 years old
- Good oral hygiene (full-mouth plaque score and full-mouth bleeding score $S \leq 25\%$).

2.3 | Exclusion criteria

- Heavy smokers (>10 cigarettes per day)
- Rehabilitated implants with overdentures
- Immediate implants
- Implants with immediate provisionalization but with delayed loading
- Implants placed with simultaneous guided bone regeneration
- Implants rehabilitated with a cemented prosthesis
- Patients who did not attend their follow-up appointments.

The reason for the exclusion of overdentures is that, in theory, implants are only subjected to traction during denture removal, and it is difficult to predict any significant loading during mastication.

The exclusion of immediate implants placed in postextraction sites and implants placed with simultaneous bone regeneration responds to the risk of introducing confounding factors in the evaluation of the results, because the integration process is hardly comparable in these procedures with regard to time, stabilization, and histology to that of an implant placed in mature bone.

Likewise, implants rehabilitated with an immediate prosthesis but without function, for example, single implants placed in the aesthetic region, were also excluded because it is not very clear whether they should be included in the delayed or immediate loading group. Immediate provisionalization is done without leaving occlusal contacts in maximum intercuspitation or excursion movements, although we are unable to control other loading factors, such as food chewing, tongue thrust, and labial pressure, we excluded these cases to eliminate these confounding factors.

We also excluded implants rehabilitated by cemented prostheses, because this retention method makes it difficult to remove the prosthesis to measure the ISQ at 6 and 12 months.

Finally, heavy smokers were excluded, because tobacco can negatively influence vascularization and bone remodeling around the implant, and we also excluded patients who did not attend their corresponding follow-up and maintenance appointments at 6 and 12 months.



FIGURE 1 Design of the two types of implants used in the study

During the period considered, a total of 153 implants were placed in 70 patients. However, 60 implants corresponding to 32 patients were removed based on the exclusion criteria of the study, leaving a total of 93 implants placed in 38 patients. Regarding the implant model used, 44 (47.3%) were Essential Cone implants and 49 (52.7%) were Vega implants (Klockner Implant System, Madrid, Spain). All patients provided their written consent to participate in this research. The experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the World Medical Association Declaration of Helsinki.

2.4 | Test groups

Cases were divided according to the loading protocol adopted. Group A included cases in which a delayed loading protocol was followed (10 weeks), independently of having performed the surgery in one phase (placing a healing plug) or in two phases (submerged). In group B, cases rehabilitated with immediate functional loading after implant placement (<48 hours) by provisional resin prosthesis splinting of all implants were included.

The implants included in the study belong to the Klockner company (Klockner Implant System), although two different implant models were used: Essential Cone, with a polished neck, and Vega, without a polished neck, at bone level platform switching, both with an internal connection (Figure 1). The implant model and its dimensions were chosen according to the clinical demands of each case. All implants included in the study were rehabilitated by means of a screw-retained prosthesis, which facilitated their removal to measure stability, taking advantage of the routine follow-up and maintenance appointments of implants. All the prostheses were made of monolithic zirconium or zirconium with a ceramic coating, and all were manufactured using CAD-CAM technology in the same prosthetic laboratory (Corus-Garbidet, Vitoria-Gasteiz, Spain).

The crown occlusion was adjusted by means of 20- μ m occlusion paper (Occlusions paper; Bausch, Köln, Germany), avoiding occlusal prematurity and interference. The adjustment was subsequently checked by a computerized occlusal analysis device Tscan (Tekscan Inc, South Boston, Massachusetts), which was used to certify that implant-supported crowns supported loading, according to a distribution conforming to the precepts of a mutually protected occlusion (Figure 2).

2.5 | Data acquisition and follow-up

The stability of each implant was measured at the following four times throughout the study:

- T0: Implant placement (mechanical stability)
- T1: Placement of the definitive prosthesis
- T2: 6 months after loading
- T3: 12 months after loading.

Implant stability was measured using a Penguin RFA device (Integration Diagnostics Sweden AB). Measurements were always

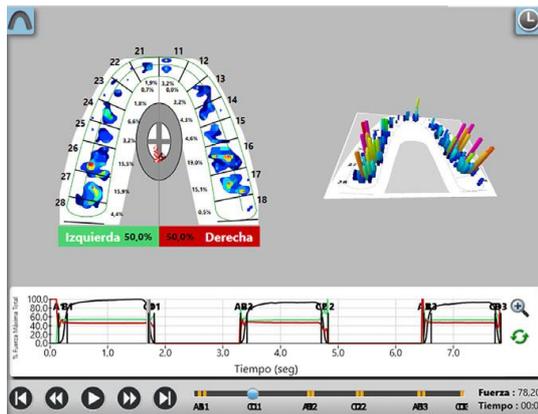


FIGURE 2 Checking occlusal adjustment and load distribution using a T-scan device



FIGURE 3 Clinical image of stability measurement using the Penguin RFA device

taken by the same operator, with the same device and the same multipleg, and always in the vestibular-lingual direction (Figure 3).

2.6 | Data analysis

A statistical analysis of the data was performed using descriptive and inferential statistical techniques. Continuous variables were expressed as the mean values and SDs, whereas for categorical variables, the number of cases and the relative percentages were used. The normality of the continuous variables was analyzed using the Shapiro-Wilk test. Given its lack of normality, the comparison between categories was made using the Mann-Whitney *U* test, which takes as a null hypothesis the equality of medians between groups. Finally, the comparison between groups of categorical variables was performed by means of Fisher exact test.

This study complies with all checklist items of the statement of the STROBE Initiative (Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology).

TABLE 1 Mean and SD values of the ISQ values in the four time points considered

	N	ISQ T0		ISQ T1		ISQ T2		ISQ T3					
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD				
Delayed	65	70.49	6.760	71	73.68	4.825	73	77.54	4.217	77	80.05	4.17	80
Immediate	28	74.68	4.406	75.5	78.36	3.870	78.5	80.61	3.966	81.5	83.07	5.913	83
All	93	71.75	6.419	73	75.09	5.025	75	78.46	4.358	78	80.96	4.930	81

Abbreviation: ISQ, implant stability quotient.

3 | RESULTS

First, no statistically significant differences were found with respect to stability values and their evolution between the two different types of implants under study when they belonged to the same loading protocol ($P > 0.05$); thus, they were analyzable only based on the protocol and not on implant type.

In group A (delayed loading), a total of 65 implants were placed in 32 patients, including 19 (59.4%) men and 13 (40.6%) women, with a mean age of 56.74 years. In group B (immediate loading), 28 implants were placed in 6 patients, 5 (83.3%) men and 1 (16.7%) woman, with a mean age of 63.68 years. Although the Fisher exact test results did not show any statistically significant differences in relation to the number of men and women assigned to each group ($P = 0.38$), there were significant differences in relation to the age of the individuals, which was slightly higher in group B, as shown by the results of the *t*-test ($T = -2.53$, $P = 0.03$).

The period of time from implant placement to the placement of the definitive prosthesis (T1) was 12.72 ± 2.34 weeks in the implants of group A and 14.33 ± 3.68 weeks in the implants of Group B.

Table 1 shows the ISQ values obtained at different study time points for the implants of both groups. These results show how the implants of group A (delayed loading) obtained a mean ISQ value of 70.49 ± 6.76 at T0 and 73.68 ± 4.825 at T1. However, ISQ values continued to rise after the prosthetic rehabilitation, even more than during the period of osseointegration, because ISQ values of 77.54 ± 4.217 were obtained at T2 and 80.05 ± 4.17 at T3. The largest increase in ISQ values occurred between T1 and T2.

However, group B implants obtained a mean ISQ value of 74.68 ± 4.406 at placement, which represents a 5.94% higher ISQ percentage than the mean of group A implants. At the time of placement of the definitive prosthesis, these implants had a mean ISQ value of 78.36 ± 3.87 . At 6 months, the mean ISQ value was 80.61 ± 3.966 , and at 12 months it was 83.07 ± 5.913 . Unlike group A implants, it should be noted that the greatest increase in ISQ values occurred between T0 and T1 (Figure 4).

Given the lack of normality of the ISQ variable at the four time points analyzed, verified by means of the Shapiro-Wilk test (T0: $W = 0.94$; $P = 0.00017$; T1: $W = 0.98$; $P = 0.071$; T2: $W = 0.97$; $P = 0.029$; T3: $W = 0.94$, $P = 0.00059$), the nonparametric Mann-Whitney *U* test was applied to check whether there were statistically significant differences between groups (immediate loading vs delayed loading) in the median value of the ISQ variable (Table 2). The results, summarized in Table 3, show the existence of statistically significant differences for the four time points considered.

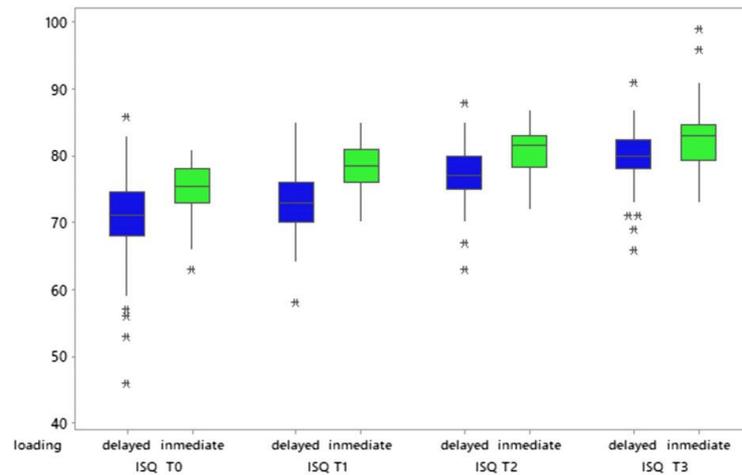


FIGURE 4 Box diagrams of ISQ values for immediate and delayed loading implants in the four time points considered. This diagram shows the time progression of the ISQ values, as well as the fact that immediate loading values are higher than delayed loading values

Finally, Table 3 shows the increase in the mean and percentage of the ISQ value both in delayed loading and immediate implants. As shown in this table, the greatest absolute increase for delayed loading implants occurred between T1 and T2, whereas for immediate loading implants, it occurred between T0 and T1. Likewise, these time points also correspond to the largest percentage increases.

4 | DISCUSSION

The results of our study show in a statistically significant way that implant ISQ tends to increase after the application of masticatory functional loading during the first year of function, which constitutes the follow-up of this study. Furthermore, this can be explained as a mechanism of bone adaptation to the strain resulting from the conversion of woven bone (primarily bone apposition on titanium and poorly load-oriented) into biomechanically more efficient lamellar bone, as some animal model studies have shown.²⁰

TABLE 2 Mann-Whitney *U* test applied to the ISQ variable at the four time points considered

	Mann-Whitney	
	Statistic (<i>U</i>)	<i>P</i> -value
ISQ T0	2660	0.0009
ISQ T1	2538.5	<0.0001
ISQ T2	2664.5	0.001
ISQ T3	2759	0.013

Abbreviation: ISQ, implant stability quotient.

TABLE 3 Mean and percentage increase in ISQ values between one time point and the next

	Increase from 0 to 1		Increase from 1 to 2		Increase from 2 to 3	
	Mean	Percent	Mean	Percent	Mean	Percent
Delayed	3.19	4.53	3.86	5.24	2.51	3.24
Immediate	3.68	4.93	2.25	2.87	2.46	3.05

Abbreviation: ISQ, implant stability quotient.

The results obtained in our retrospective clinical trial coincide with the results of other previously published studies, which, although not sharing our objective, also measured implant stability by means of RFA at prosthesis insertion, as well as after 6 and/or 12 months of loading.

This is the case of the study by Sjöström and colleagues, who for 6 months monitored the stability of 212 Brånemark implants placed in regenerated bone, using 10 implants as a control in mature bone. Implant stability in the study group was 61.5 ± 9.0 ISQ at placement and 62.5 ± 5.2 after 6 months of loading, whereas in the control group, the initial stability was 58.5 ± 4.7 ISQ and it was 63.0 ± 5.6 after 6 months of loading, which implies an increase of 1.63% and 7.69% in the ISQ, respectively, after the loading period.²¹ It should be noted that the mean values of stability obtained in this study are significantly lower than ours. This fact might be because in the Sjöström study, implants were placed in the edentulous maxilla, which, although in the case of the controls did not require a regeneration technique, suggests the presence of low-density bone, type IV according to the classification of Lekholm and Zarb.²² In contrast, in our study, implants placed in regenerated areas were excluded, whereas cases in the lower jaw were included with type I and type II bones. Several studies have shown a directly proportional relationship between bone density and primary stability,^{23–25} which justifies the values significantly lower than those in our study. Another explanation may lie in the implants used in both studies. Although Sjöström and colleagues used a parallel-walled implant (Brånemark MKII), implants included in our study present a more conical design (Klockner Essential Cone,

Klockner Vega; Klockner Implant System), which provides greater primary stability.^{26,27} Another variable possibly related to this difference is the milling protocol followed,²⁸ which can also influence stabilization and, in our case, corresponded strictly to that recommended by the manufacturer (Klockner Implant System) without over- or under-milling of the implant bed in height or width. Nevertheless, it should be noted that when stability increments implemented after 6 months of loading were reviewed, we observed similar results in the control group of Sjöstrom and colleagues (7.69%) and in our conventional loading group (5.30%), both groups being of comparable characteristics due to protocol homogeneity.

Similar results can be observed in the clinical study of Degidi and colleagues, in which the 6- and 12-month stability of 63 implants placed with prior sinus elevation (group A) and 17 implants placed in mature bone or postextraction alveoli (group B) was analyzed. The mean ISQ was 62.12 ± 10.62 for group A and 61.41 ± 10.14 for group B at implant placement.²⁹ The mean ISQ was 66.0 ± 7.7 after 6 months of loading and 70.0 ± 5.9 after 12 months of loading for group A, and 61.5 ± 10.5 after 6 months and 66.7 ± 4.5 after 12 months for group B. This represents an increase in the ISQ of 6.24% after the first 6 months of loading in group A and 0.15% in group B, increasing these percentages after the 12-month period (12.69% and 8.61%, respectively).³⁰ As in the study by Sjöstrom and colleagues, mean primary stability was significantly lower than ours. The reason could be that implants in the study group were placed in the maxilla needing sinus elevation, which demonstrates lower density and poor bone availability. On the other hand, in the control group, although sinus elevation was not required, immediate implants placed in postextraction alveoli were included,³¹ which hinders achieving good primary stability. This also justifies that the SD of the results is wide. However, the great difference with respect to our results is that the authors find the greatest increases in ISQ values between 6 and 12 months after loading, instead of the first 6 months. This difference must be explained by the particular design of the study by Degidi and colleagues, evaluating two groups but, in reality, three conditions: mature bone, postextraction bone, and regenerated sinus. The last two can hardly be compared with our sample when the postextraction has a gap to regenerate and the sinus a xenograft whose substitution rate is scarce. Both situations must strongly influence the biomechanical behavior of peri-implant bone.

Finally, the study of Dottore and colleagues analyzed the stability of 42 implants placed in an augmented posterior mandible after alveolar osteotomy after 6 and 12 months of loading. The authors reported ISQ values of approximately 75 at placement, 76 after 6 months of loading, and 75 after 12 months.³² These results are similar to those obtained in our study; however, this article does not clearly express its results regarding ISQ variation, which makes it difficult to compare them with those of our study.

A substantial difference between these three studies and ours is the RFA instrument used to measure stability. Although these studies used an Ostell ISQ device (Ostell, Gothenburg, Sweden), we use Penguin RFA (Integration Diagnostics Sweden AB). However, the use of a different instrument should not make a difference in the measurement results, because both devices use the same standardized measurement unit, the ISQ. In any case, even if the absolute values of

both devices could not be compared, the evolution of these values, which is the key of our study, is comparable between systems.

Our study also has the particularity of assessing and comparing the evolution of stability according to the loading protocol, for which the most clinically significant results were obtained. In this sense, initial stability values were higher for the immediate loading group (70.49 ± 6.76 for group A and 74.68 ± 4.41 for group B). This can be explained if it is taken into account that, from a clinical point of view, high ISQ values are considered as a favorable prognostic factor for this type of loading.³³ In short, as the implants included in this study belong to a private practice, an ISQ value greater than 60 has been considered as a threshold to determine the indication of immediate or no load, in those patients who demanded this type of procedure.³⁴ In addition, implant stability after 12 months of loading is also greater in rehabilitated immediate loading implants than in delayed loading implants. It is difficult to affirm whether that greater stability is because group B implants started from higher values or due to the effect produced by the biomechanical stimulation of the implant from the first moment after its placement. What is clear is that this stimulation exists from the beginning, if one takes into consideration that the most striking difference between the two groups is that while in group A the greatest increase occurs between T1 and T2 (ie, after prosthesis placement), in group B the greatest increase occurs between T0 and T1, when the provisional prosthesis is placed under immediate loading. This fact shows that implant loading exerts a positive action in osseointegration, with increased biological stability, which is higher than when implants are not subjected to loading. Based on these results, we could say that immediate or early loading not only allows the immediate rehabilitation of function and aesthetics, which results in patient comfort and satisfaction, but is also possible and predictable. The results also show that in the delayed loading implant, bone adaptation should be expected as soon as it is rehabilitated, and this process will be mediated by inflammation. Indeed, the process of remodeling that is activated will be mediated by the release of mesenchymal cells (PDGF and BMP) and certain substances that induce inflammatory signals (TNF, COX2, and NO) and affect osteoclastic differentiation (RANKL, OPG, and MCSF).¹⁶ The consequence will be an adaptation of the mass and structure of the primary arrangement of woven bone, giving rise to lamellar bone¹¹ deposited on the threads of the implant and oriented following the load lines, similar to the design of a building buttress. The results support certain procedures, such as the progressive loading protocol proposed by Misch, to rehabilitate implants placed in low-density bones and with low stability values through the application of controlled loading and by progressively increasing the magnitude of loading to cause a biomechanical stimulation of peri-implant bone, resulting in greater bone apposition and an increase in its biological stability.³⁵

This clinical study demonstrates the effect produced by occlusal loading on the biological stability of implants analyzed by resonance frequency. It should be considered that because resonance frequency is a physical variable with biometric indications because it expresses changes in the mass or elasticity of supporting bone (it is understood that neither of them occurs in the implant), our results of increased ISQ values after loading must respond to bone-to-implant contact (BIC) modifications or changes in the elastic response of the

supporting bone, the latter as a phenomena of the adaptation to load (modification in the percentage or disposition of the bone mineral matrix). BIC modifications are inherent to osseointegration and should not be discarded from the group of immediate loading implants. However, the modifications are difficult to defend as a cause for the delayed loading group, in which, due to the mean waiting time (12.72 ± 2.34 weeks), the integration process should have been considered concluded. In any case, previous studies determined that the ISQ expressed the rigidity of the BIC but not the BIC itself.³⁶ Based on this assumption, the theory of the elastic response modification based on an efficient reorientation of bone trabeculae as an abutment acquires weight. However, it must be admitted that this is precisely a limitation of our study, which shows the difference in the contour conditions of peri-implant bone due to loading and depending on its timing, but because of its design, it is not capable to determine whether this is due to one or another assumption (BIC or modification of the elastic response). For this purpose, a histomorphometric analysis would be necessary, either by histology or especially using micro-CT, both in animal model tests due to ethical reasons.

The literature includes certain studies of this style with results that indirectly support our theory. Lanyon conducted an experimental study in sheep where they demonstrated that the principal trabecular orientations coincided with the principal compressive and principal tensile strain directions.³⁷ Later, Hayes and Snyder conducted an intensive study of the human patella, which concluded that its trabecular orientations are highly correlated with principal stress directions, as determined by finite element analysis.³⁸ It is clear that studies of this methodology, but with osseointegrated implants, are needed to understand the real influence of the load on a biocompatible metal alloy and are a task in development by the research group (Osteosite Foundation by Synergia) to which the authors belong.

Finally, it is interesting to observe in our study that there are only two implants in which stability values after 6 months are lower than at prosthesis placement. If we analyze them in detail, we observe that one of them (patient 5, group A) is an implant without an antagonist tooth, so it does not participate in occlusion and has no masticatory function, and therefore does not receive a biomechanical stimulus in the form of a load. The other case (patient 11, group A) coincidentally came to the 6-month follow-up visit with a loose retaining screw of the prosthesis by loss of preload and mobility of the crown. On radiographic examination, we observed an early marginal bone loss of 1-2 mm, which would also explain the decrease in the ISQ. After correctly cleaning the implant connection and the base of the crown, and after tightening the screw again to 30 N, a recovery of the ISQ was observed at 12 months, although without reaching the initial values. Again, the explanation is probably that the lost bone level did not recover, but a biomechanical adaptation of the remaining crestal bone was achieved.

5 | CONCLUSIONS

Despite the aforementioned limitations of this study, the results obtained allow us to infer the following conclusions:

- The functionalization of dental implants through the placement of implant-supported fixed prostheses increases their stability, measured in ISQ values by means of RFA.
- The increase in ISQ values is greater during the months immediately following loading. In cases of immediate loading, the greatest increase occurs in the first weeks after implant placement during the integration process, whereas in cases of delayed loading, the greatest increase occurs once the implant is finished and after prosthesis placement.
- This increase in stability may be because the biomechanical stimulus exerted by occlusion provokes a disposition and distribution of function-oriented peri-implant bone trabeculae, in such a way that they favor efficient load transmission to the supporting bone and facilitate stress dissipation.
- It is demonstrated that immediate or early loadings are not only possible but can also be beneficial to achieve a faster increase in implant stability in order to promote bone apposition on the surface of the implant oriented to the load from the moment of its placement and thus avoiding subsequent remodeling processes that may be accompanied by unwanted inflammatory events.
- Histological studies are needed to demonstrate this theory and explain the process of bone remodeling that occurs around the implant when it is under load.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

ORCID

Aritza Brizuela-Velasco  <https://orcid.org/0000-0001-6421-3863>

David Chávarri-Prado  <https://orcid.org/0000-0002-3670-3424>

REFERENCES

1. Wolff J. *The Law of Bone Remodeling*. New York, NY: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1892.
2. Marotti G. The osteocyte as a writing transmission system. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2000;1:133-139.
3. Hazelwood SJ, Martin RB, Rashid MM, Rodrigo JJ. A mechanistic model for internal bone remodeling exhibits different dynamic responses in disuse and overload. *J Biotechnol*. 2001;34:299-308.
4. Burr DB, Martin RB, Schaffer MB, Radin EL. Bone remodeling in response to in vivo fatigue micro damage. *J Biotechnol*. 1989;22:231-244.
5. Rangert B, Gunne J, Sullivan DY. Mechanical aspects of a Brånemark implant connected to a natural tooth: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991;6:177-186.
6. Brunski JB. Biomaterials and biomechanics in dental implant design. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988;3:85-97.
7. Watanabe M, Hattori Y, Satoh CH. Biological and biomechanics perspectives of normal dental occlusion. *International Congress Series*. 2005;1284:21-27.
8. Haraldson T, Carlsson GE. Bite force and oral function in patients with osseointegrated oral implants. *Scand J Dent Res*. 1977;85:200-208.
9. Jacobs R, Van Steenberghe D. Review article: from osseo-perception to implant-mediated sensory-motor interactions and related clinical implication. *J Oral Rehabil*. 2006;33:282-292.
10. Klineberg IJ, Trulsson M, Murray GM. Occlusion on implants - is there a problem? *J Oral Rehabil*. 2012;39:522-537.

11. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000. 1998;17:22-35.
12. Rhineland FW. Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1974;105:34-38.
13. Brånemark PI. Tooth replacement by oral endoprostheses: clinical aspects. *Int J Oral Implantol*. 1988;5:27-29.
14. Al-Sawai AA, Labib H. Success of immediate loading implants compared to conventionally-loaded implants: a literature review. *J Investig Clin Dent*. 2016;7:217-224.
15. Norton MR. The influence of insertion torque on the survival of immediately placed and restored single-tooth implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26:1333-1343.
16. Gruber R, Koch H, Doll BA, Tegtmeyer F, Einhorn TA, Hollinger JO. Fracture healing in the elderly patient. *Expl Gerontol*. 2006;41:1080-1093.
17. Santamaría-Arrieta G, Brizuela-Velasco A, Fernández-González FJ, et al. Biomechanical evaluation of oversized drilling technique on primary implant stability measured by insertion torque and resonance frequency analysis. *J Clin Exp Dent*. 2016;1:307-311.
18. Meredith N. Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont*. 1998;11:491-501.
19. Brizuela-Velasco A, Álvarez-Arenal Á, Gil-Mur FJ, et al. Relationship between torque and resonance frequency measurements, performed by resonance frequency analysis, in micromobility of dental implants: an in vitro study. *Implant Dent*. 2015;24:607-611.
20. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14:251-262.
21. Sjöstrom 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 Maxillofac Surg*. 2005;34:45-51.
22. Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In: Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T, eds. *Tissue Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. 1st ed. Chicago, IL: Quintessence; 1985:199-209.
23. Sennerby L, Andersson P, Verrocchi D, Viinamäki R. One-year outcomes of neoss bimodal implants. A prospective clinical, radiographic, and RFA study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012;14:313-320.
24. Farré-Pagés N, Augé-Castro ML, Alaejos-Algarra F, Mareque-Bueno J, Ferrés-Padró E, Hernández-Alfaro F. Relation between bone density and primary implant stability. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16:62-67.
25. Sim CP, Lang NP. Factors influencing resonance frequency analysis assessed by Osstell mentor during implant tissue integration: I. Instrument positioning, bone structure, implant length. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21:598-604.
26. Valente ML, de Castro DT, Shimano AC, Lepri CP, dos Reis AC. Analysis of the influence of implant shape on primary stability using the correlation of multiple methods. *Clin Oral Investig*. 2015;19:1861-1866.
27. Romanos GE, Ciornei G, Jucan A, Malmstrom H, Gupta B. In vitro assessment of primary stability of Straumann® implant designs. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014 Feb;16:89-95.
28. Glauser R, Sennerby L, Meredith N, et al. Resonance frequency analysis of implants subjected to immediate or early functional occlusal loading. Successful vs. failing implants. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15:428-434.
29. Degidi M, Daprile G, Piatelli A, Carinci F. Evaluation of factors influencing resonance frequency analysis values, at insertion surgery, of implants placed in sinus-augmented and nongrafted sites. *Clin Implant Dent Rel Res*. 2007;9:144-149.
30. Degidi M, Daprile G, Piatelli A. RFA values of implants placed in sinus grafted and nongrafted sites after 6 and 12 months. *Clin Implant Dent Rel Res*. 2009;11:178-182.
31. Granić M, Katanec D, Vučićević-Boras V, Sušić M, Jurić IB, Gabrić D. Implant stability comparison of immediate and delayed maxillary implant placement by use of resonance frequency analysis—a clinical study. *Acta Clin Croat*. 2015;54:3-8.
32. Dottore AM, Kawakami PY, Bechara K, et al. Stability of implants placed in augmented posterior mandible after alveolar osteotomy using resorbable nonceramic hydroxiapatite or intraoral autogenous bone: 12-month follow-up. *Clin Implant Dent Rel Res*. 2012;16:330-336.
33. Östman PO, Hellman M, Sennerby L. Immediate occlusal loading of implants in the partially edentate mandible: a prospective 1-year radiographic and 4-year clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23:315-322.
34. Sennerby L, Meredith N. Analisi della frequenza di risonanza (RFA). Conoscenze attuali e implicazioni cliniche. In: Chiapasco M, Gatti C, eds. *Osteointegrazione e carico immediato. Fondamenti biologici e applicazioni cliniche*. Milan, Italy: Masson; 2002:19-31.
35. Misch CE. Progressive bone loading. In: Misch CE, ed. *Dental Implant Prosthetics*. St Louis: Mosby; 2005:511-530.
36. Abrahamsson I, Linder E, Lang NP. Implant stability in relation to osseointegration: an experimental study in the Labrador dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20:313-318.
37. Lanyon LE. Analysis of surface bone strain in the calcaneus of sheep during normal locomotion. Strain analysis of the calcaneus. *J Biomech*. 1973;6:41-49.
38. Hayes WC, Snyder B. *Toward a Quantitative Formulation of Wolff's Law in Trabecular Bone. Mechanical Properties of Bone*. New York, NY: American Society of Mechanical Engineers; 1981:43-68.

How to cite this article: Brizuela-Velasco A, Chávarri-Prado D. The functional loading of implants increases their stability: A retrospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018;1–8. <https://doi.org/10.1111/cid.12702>

PÓSTER PRESENTADO EN CONGRESO OSTEOLOGY BARCELONA (2019)



THE INFLUENCE OF THE LOAD ON BONE MASS AND STRUCTURE AROUND DENTAL IMPLANTS: THE BONE BUTTRESS THEORY.



Universidad de Oviedo

David Chávarri-Prado^{1,2}, Aritza Brizuela-Velasco^{1,2}, Ángel Álvarez-Arenal¹,
Esteban Pérez-Pevida^{2,3}, Antonio Jiménez-Garrudo^{2,3}, Markel Diéguez-Pereira^{1,2}.

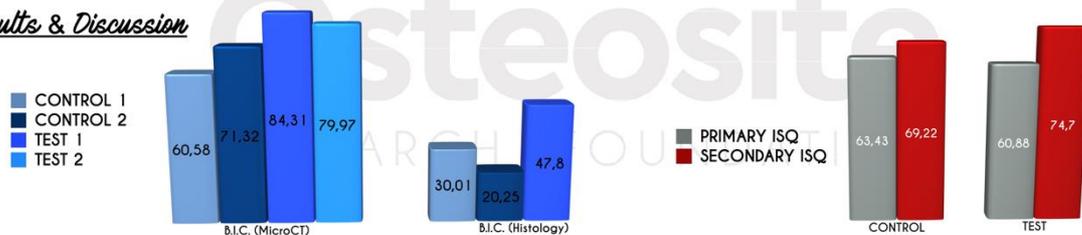
¹ Faculty of Dentistry, University of Oviedo. ² Faculty of Dentistry, Catholic University of Murcia. ³ Faculty of Medicine, University of Salamanca.

Objectives:

The classic works of Wolff's Law (1892) and Frost's Mechanostat (1987) suggest that bone apposition and remodeling are physiological processes that respond to the biomechanical demand that each bone receives. The hypothesis of this pilot study is that the same happens during the osseointegration of dental implants, and the objective is to determine the influence of the biomechanical stimulus in the disposition of the bone around dental implants, as well as in the implant stability measured by resonance frequency analysis.

Material & Methods

Results & Discussion



This study corroborates the results of the retrospective clinical study that we published a few months ago, which showed a greater increase in implant stability when the implants are subjected to functional loading. Our theory is that when an implant is subjected to loading, the bone trabeculae are rearranged and distributed oriented to the load, like the flying buttresses of a Gothic cathedral. (**The Bone Buttress Theory**)

With the limitation of such a small sample size, the conclusions of this pilot study are:

1. The biomechanical stimulus produces a greater biological stability of dental implants measured by RFA.
2. Implants placed in bone subjected to loading achieve a better osseointegration, in terms of BIC.
3. This may imply a paradigm shift in traditional implant rehabilitation protocols, since it demonstrates that immediate or early loading may be beneficial from the point of view of osseointegration and bone disposition around implants.
4. It is necessary to increase the sample size to corroborate the results of this pilot study and be able to confirm the conclusions obtained in it.

References

- Wolff J. The Law of Bone Remodeling. Berlin Heidelberg New York. 1892.
 Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anatomical Record*. 1987;219:1-9.
 Brizuela-Velasco A, Chávarri-Prado D. The functional loading of implants increases their stability: A retrospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018;1-8.
 Seo DY, Lee SR, Kim N, Ko KS, Rhee BD, Han J. Humanized animal exercise model for clinical application. *Pflügers Arch*. 2014;466(9):1673-87.
 Gaustad SE, Polim N, Wisloff U. A valid and reproducible protocol for testing maximal oxygen uptake in rabbits. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2010;17(1):83-8.



David Chávarri Prado

Lucerne, 14 June 2019

International Osteology Symposium Barcelona 2019 – Poster Confirmation

To whom it may concern,

The Osteology Foundation promotes research, education and collaboration between universities and industry in the field of oral and maxillofacial tissue regeneration. The objective is to make new techniques and products available to practitioners quicker and with greater goal orientation.

To this end, the Osteology Foundation organised a symposium focusing on "THE NEXT REGENERATION" in the field of regenerative dental medicine on 25-27 April 2019 at the CCIB congress centre in Barcelona, Spain.

David Chávarri Prado participated in this symposium by presenting a poster entitled "*The influence of the load on bone mass and structure around dental implants: The Bone Buttress Theory.*", which was exhibited and presented during the 3-day symposium.

If you need any further information, please do not hesitate to contact me.

Yours respectfully,



Dr. Kristian Tersar
Executive Director
Osteology Foundation

CONFERENCIA IMPARTIDA EN SCOI KEYSTONE (2019)



ESTUDIO EXPERIMENTAL IN VITRO SOBRE LA INFLUENCIA DE LA CORTICAL Y EL DISEÑO DEL IMPLANTE EN LA ESTABILIDAD PRIMARIA. PUBLICADO EN JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL DENTISTRY (2020)

J Clin Exp Dent. 2020;12(3):e242-8.

Measuring stability by two different devices

Journal section: Oral Surgery
Publication Types: Research

doi:10.4317/jced.56014
<https://doi.org/10.4317/jced.56014>

Influence of cortical bone and implant design in the primary stability of dental implants measured by two different devices of resonance frequency analysis: An *in vitro* study

David Chávarri-Prado ¹, Aritza Brizuela-Velasco ², Markel Diéguez-Pereira ¹, Esteban Pérez-Pevida ², Antonio Jiménez-Garrudo ², Iratxe Viteri-Agustín ³, Alejandro Estrada-Martínez ¹, Oier Montalbán-Vadillo ²

¹ Department of Surgery and Medical-Surgical Specialties, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Oviedo, Oviedo, Spain

² Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

³ Department of Surgery, Gynecology and Obstetrics, Faculty of Sport and Health Sciences, University of Zaragoza, Huesca, Spain

Correspondence:

Department of Surgery and Medical-Surgical Specialties
Faculty of Medicine and Dentistry
University of Oviedo
Catedrático Jose Maria Serrano 8
Oviedo, Asturias, Spain
davidchavarr@hotmmail.com

Received: 23/06/2019
Accepted: 08/01/2020

Chávarri-Prado D, Brizuela-Velasco A, Diéguez-Pereira M, Pérez-Pevida E, Jiménez-Garrudo A, Viteri-Agustín I, Estrada-Martínez A, Montalbán-Vadillo O. Influence of cortical bone and implant design in the primary stability of dental implants measured by two different devices of resonance frequency analysis: An *in vitro* study. J Clin Exp Dent. 2020;12(3):e242-8.

Article Number: 56014 <http://www.medrxiv.com/doi/10.1101/2019.06.13.19161111>
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689316 - eISSN: 1989-5488
eMail: jced@jced.es
Indexed in:
Pubmed
Pubmed Central® (PMC)
Scopus
DOI® System

Abstract

Background: This study aimed to evaluate the effect of the implant design and the presence of cortical bone in the primary stability, as well as analyze the differences between the stability measurements obtained by two different resonance frequency analysis (RFA) devices.

Material and Methods: A total of 80 Klockner implants of two different models [40 Essential Cone implants (group A) and 40 Vega implants (group B)] were used. The implants were placed in two polyurethane blocks that simulated the mechanical properties of the maxillary bone. One block featured a layer of cortical bone that was absent from the other block. The primary stability of all implants was measured by insertion torque and RFA using two different devices: Penguin RFA and Osstell IDX.

Results: Primary stability was superior in the cortical bone in both torque and RFA. In the block containing cortical bone, group A implants obtained a greater insertion torque than did group B. The insertion torque was lesser in the bone lacking cortex. Regarding the ISQ of the implants, group A presented higher values in the block with cortical bone, but the values were lower in the block without cortical bone. There were no significant differences between the values obtained from the Osstell IDX and Penguin RFA.

Conclusions: The presence of cortical bone positively influences the primary stability of dental implants. The design of the implant also has a statistically significant influence on implant primary stability, although the impact depends on whether there is coronal cerclage or not. There were no statistically significant differences in the implant stability measurements obtained by two different devices.

Key words: Implant stability, resonance frequency analysis, torque, osstell, penguin, cortical.

Introduction

Recently, implant stability has been defined as the absence of clinical mobility under a given load, and it is considered one of the main requirements for the achievement and maintenance of the osseointegration of a dental implant (1,2). This stability can be influenced by multiple factors, such as the density of the recipient bone, the surgical technique or the design of the implant itself (3). Regarding bone density, several authors have shown that the presence of cortical bone increases the primary stability of the implant, since it provides one or several anchorages in a bone of a much greater density compared to implants fixed only in the trabecular bone, which is much less dense (4-10). However, it would be appropriate to discuss which of the two cases would produce the best osseointegration or the best biomechanical behaviour in response to the load. This question is derived from the better mechanical properties offered by the cortical bone due to its higher mineral content and higher density, but conversely, it shows much poorer vascularity and significantly lower cellularity, which could influence its secondary stability (11).

Secondary, or biological, stability is the result of the physiological processes of bone apposition and remodelling on the surface of the implant, which leads to osseointegration (12-15). It is a dynamic parameter that can vary throughout the functional life of the implant, unlike primary, or mechanical, stability, which is a static parameter obtained in a single moment of time on the day of its placement (3,16,17). Primary stability is a purely mechanical concept that results from the friction or resistance between the bone and the implant upon insertion (18,19).

Over the years, different methods have been used for the measurement of stability (15). These methods can be classified as invasive and non-invasive. Invasive methods include histology, which evaluates the bone-to-implant contact percentage, and disinsertion torque (20). Both methods require removal of the implant; therefore, they present no clinical applicability. For clinical applications, non-invasive methods must be used, such as percussion testing, which is unreliable and highly subjective, since it depends on interpretation by each clinician of the frequency of the sound emitted by the implant when it is hit with the handle of a mirror (21). Therefore, Brizuela *et al.* (22) proposed a method for the measurement of implant stability based on an objective interpretation of this frequency, but to date, this method has not yet been developed for use in clinical practice. A different non-invasive method for measuring implant stability is the periotest. The periotest is an objective method developed by Schuttler in 1993, created to measure the mobility of teeth in periodontal disease. The method uses an electronic device with a punch that pushes the tooth and measures its lateral displacement, delivering objective

stability values on a scale from -8 to +50 (23-25). Inconveniently, as this method was developed to measure tooth mobility, it presents insufficient sensitivity to measure micromotion in implants, since teeth, being surrounded by the periodontal ligament, present significantly greater mobility than do implants (26-28).

Another non-invasive method is measurement of the insertion torque, which is widely referenced in the literature and currently very widespread clinically (13,29). The torque is the resistance required to move the implant in the bone forward in the apical direction. Although it has been shown to maintain an inverse relationship with micromotion, statistically it is not linearly but exponentially maintained. Thus, at low torque values, small increases in torque generate large reductions in micromotion, while for high torque values, large increases in torque barely reduce the degree of micromotion (18). Insertion torque can only be measured once, at the time of implant placement. Since it does not allow subsequent remeasurement of the stability, it does not facilitate controlling and monitoring the biological stability of the implant.

Thus, resonance frequency analysis (RFA) is currently the only non-invasive method for objectively measuring and monitoring implant stability (17). The method is based on detection of the natural frequency of vibration of the implant within the bone, which depends on the rigidity of implant attachment and its mass, as can be deduced from the following formula, where “f0” is the natural frequency of vibration, “k” is the stiffness constant, and “m” is the mass, (Fig. 1).

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}$$

Fig. 1: Formula.

Therefore, the RFA device relies on the physical phenomenon of resonance to determine the natural frequency of vibration of each implant and thus provide the clinician an implant stability quotient value (ISQ) on a scale of 0 to 100 (30).

Currently, there are several devices on the market that use RFA as a method of measuring implant stability, such as the Osstell IDX (Osstell, Gothenbourg, Sweden) and the Penguin RFA (Integration Diagnostics Sweden AB, Gothenburg, Sweden) (31,32).

The objective of the present *in vitro* experimental study was to determine the influence of the presence of cortical bone and how the design of the implant impacts implant stability, as well as to compare the results of the measurements obtained using two different RFA devices.

Material and Methods

-Implant design

Eighty Klockner internal connection implants were used (Klockner Implant System, Madrid, Spain), all with the same diameter and length (4×10 mm), divided equally

into two model implant models with very different designs. Forty of the implants were used in the Essential Cone® model (Group A), while the remaining 40 were placed in the Vega® model (Group B). The main difference between these two implant models is that the Vega implant is a “bone level” implant model with a surface treatment across the entire model, while the Essential Cone implant is of the “tissue level” type and features a neck of 1.5 mm of fully polished, machined surface, which must be maintained in a suprabony position (Fig. 2).



Fig. 2: Shows the two types of implants used in the study: Klockner Essential Cone and Klockner Vega.

-Bone specimens

To simulate the supporting bone, two polyurethane blocks (Sawbones®, Pacific research Laboratories Inc., Washington, USA) were used, with a density of 0.32 gr/cm³, which reproduces the mechanical properties of the human posterior maxilla (33,34). One of the blocks had a 1-mm layer of a resin with a much higher density (1.64 gr/cm³) on the top of its surface, simulating the presence of cortical bone, while the other block consisted solely of trabecular bone (Fig. 3).

-Drilling and implant insertion protocol

For implant placement, the milling protocol recommended by the manufacturer (Klockner Implant System, Madrid, Spain) was followed. Despite two different implant models being used, the same milling sequence was suggested for both.



Fig. 3: Shows one of the polyurethane blocks used in the study, where the imitation of cortical and trabecular bone can be observed.

For measurement of the implant stability, two different methods were used. First, the insertion torque of each implant was measured with a correctly calibrated digital torque meter AMG 100N (Mecmesin, Barcelona, Spain). Then, the stability of the implants were measured using two RFA devices of different brands: Osstell IDX® and Penguin RFA®. To compare the similarity of the measurements from the two devices, 4 measurements were conducted per implant. The add-on devices presented by each brand were also used: Osstell + Smartpeg, Osstell + Multipeg, Penguin + Multipeg and Penguin + Smartpeg.

-Stability measurements

Each measurement was conducted in the same orientation, and both the Multipeg and the Smartpeg were tightened by applying the force recommended by the manufacturer (6-8 N) using a torque wrench with an ad hoc screwdriver (Fig. 4). Since the Multipeg features ti-

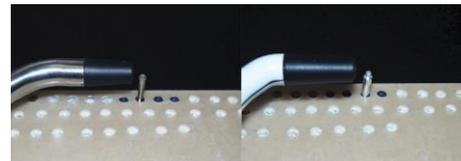


Fig. 4: Shows the procedure of stability measurement with RFA using an Osstell IDX with Multipeg device (left) and using a Penguin RFA device with Smartpeg (right).

tanium fabrication and can be used repeatedly as many times as desired, it was used for the entire study. However, the Smartpeg is made of aluminium and has limited use. Since the material of the device is softer than that of the implant, the thread deteriorates and the measurement of the ISQ loses reliability. The manufacturer recommends a maximum of 10 uses per Smartpeg, but a study published by Brizuela *et al.* in 2015 guaranteed at least 20 uses; thus, for this work, 4 Smartpegs were used, one for each study group (35).

-Statistical analysis

Statistical analysis of the data was carried out by applying descriptive and inferential statistic techniques. For description of the continuous variables, means and standard deviations were used. Normality was checked using the Shapiro-Wilk test. Given the lack of normality, comparison between categories was conducted through

the Kruskal-Wallis test, considering the equality of medians between groups as a null hypothesis. Finally, the strength of the relationships between variables was studied using the Pearson correlation coefficient.

Results

The results of this *in vitro* experimental study revealed that the primary stability of each implant was significantly higher in the block that simulated the presence of cortical bone than in that with only trabecular bone. The insertion torque of the implants of group A was 33.52 ± 6.29 N•cm in the cortical bone and 12.38 ± 2.20 N•cm without cortical bone, while in group B, the torque was 20.47 ± 3.74 N•cm with cortical bone and 14.01 ± 2.47 N•cm without cortical bone. Through analysis with a two-way ANOVA test, it was observed that both the type of implant ($p < 0.001$) and the presence of cortical bone ($p < 0.001$), as well as the interaction of both variables, were significant ($p < 0.001$).

Regarding the design of the implant, the torque results showed statistically significant differences between both groups when they were placed in the block with cortical

bone (33.53 ± 6.29 N•cm vs 20.47 ± 3.74 N•cm) ($p < 0.001$) and when they were placed in bone without cortical cerclage (12.38 ± 2.20 N•cm vs 14.01 ± 2.47 N•cm) ($p = 0.034$).

Table 1 shows the insertion torque of group A implants with and without cortical bone, while Table 2 shows the same information for group B.

Regarding torque and RFA note that there was a strong correlation between the ISQ values obtained using the different devices (Osstell or Penguin) and the different add-ons (Multipeg or Smartpeg), with all of these correlations being above 0.95, while the correlation values of the torque with the ISQ variables ranged between 0.81 and 0.87 (Table 3).

In addition, a strong influence of the presence or absence of cortical bone on the ISQ values was observed in the implants of both group A and group B (Tables 1,2), with statistically significant differences in each torque and ISQ-analysed variable. For example, considering the measurements obtained using Penguin with Multipeg, note that the ISQ in the cortical block was 77.07 ± 1.80 for the implants of group A and 64.80 ± 4.40 for

Table 1: Group A (EC). Mean values and standard deviation, as well as comparison between groups, with and without cortical bone.

	Torque	Penguin+ Multipeg	Penguin+ Smartpeg	Osstell+ Multipeg	Osstell+ Smartpeg
With Cortical	33,52 (±6,29)	77,10 (±1,80)	77,60 (±2,23)	75,30 (±1,53)	75,70 (±1,69)
Without cortical	12,38 (±2,20)	55,70 (±2,68)	53,90 (±2,59)	57,40 (±3,46)	56,20 (±2,42)
p-value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Table 2: Group B (VEGA). Mean values and standard deviation, as well as comparison between groups, with and without cortical bone.

	Torque	Penguin+ Multipeg	Penguin+ Smartpeg	Osstell+ Multipeg	Osstell+ Smartpeg
With Cortical	20,47 (±3,74)	64,80 (±4,40)	67,85 (±5,19)	66,35 (±3,53)	68,20 (±3,87)
Without cortical	14,01 (±2,47)	60,25 (±2,36)	62,05 (±3,24)	62,30 (±2,23)	63,95 (±2,72)
p-value	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Table 3: Correlation coefficients relating the variables TORQUE and ISQ with different devices and different abutments.

	TORQUE	ISQ PENGUIN +MULTIPEG	ISQ PENGUIN +SMARTPEG	ISQ OSTELL +MULTIPEG
ISQ PENGUIN +MULTIPEG	0,862			
ISQ PENGUIN +SMARTPEG	0,834	0,962		
ISQ OSTELL +MULTIPEG	0,840	0,978	0,960	
ISQ OSTELL +SMARTPEG	0,819	0,951	0,990	0,955

the implants of group B, while in the block without cortical bone, ISQ values of 55.70 ± 2.68 for the implants of group A and 60.25 ± 2.36 for those of group B were presented.

The average torque value of the implants of group A was 22.90 ± 11.70 , while that of group B was 17.24 ± 4.53 , indicating statistically significant differences between the groups ($p < 0.006$). In the case of ISQ, the results obtained were compared with those from the two devices and add-ons, without indication of statistically significant differences between the groups ($p = 0.696$).

Discussion

To carry out this study, polyurethane blocks were used to reliably reproduce the mechanical properties of the human maxillary bone. Previous studies have demonstrated that artificial bone blocks were useful to simulate cortical and trabecular bone conditions in a controlled manner. Multiple published articles have used this type of study model (4,33,36-40). The advantage of this type of block over the animal bone *ex vivo* model is the homogeneity of the samples in terms of macroscopic characteristics; therefore, using this type of *in vitro* model guarantees that each implant is placed in an identical bone model with the same density. The density and thickness of the artificial bone material was chosen with consideration of the human trabecular bone and combined cortical bone.

This study demonstrates the influence of cortical anchorage on the primary stability of dental implants, expressed both in insertion torque and in ISQ values, and the results agree with those of several previously published works. For example, in 2014, Kim *et al.* (4) placed dental implants in polyurethane blocks, as performed in this study. Likewise, they also measured implant stability by both insertion torque and RFA. The results showed that an increase in the thickness of the cortical bone portion generated an increase of both stability parameters. These findings also agree with those obtained by Miyamoto *et al.* in 2005 (5) in a clinical study wherein the existence of a strong statistical correlation was demonstrated between the cortical bone thickness and the ISQ values obtained by RFA.

The results of this study also demonstrate significant influence of the implant design on the primary stability of the implant. Upon using implants of the same diameter and length placed following exactly the same milling protocol, Essential Cone implants (Group A) obtained greater primary stability in the block with cortical bone in terms of both insertion torque ($32,93 \pm 6.29$ vs. 20.19 ± 3.74) and ISQ values (77.07 ± 1.80 vs. 64.65 ± 4.39 using Penguin RFA + Multipeg). This difference can be explained by the design of the cervical region of the implant. With a wider coronal zone, implants can provide greater resistance to advancement in an apical

direction, requiring significantly higher torque values. From a clinical approach, obtaining very high torque values ($> 40 \text{ N/cm}^2$) is not beneficial, since as demonstrated by Brizuela *et al.* (18), these levels of torque reduce micromotion, and therefore, the odds of success of the osseointegration process are not increased. Excessive torque can also cause strong compression of the coronal cortical bone, which would result in the appearance of microfractures in and subsequent resorption of the bony trabeculae around the implant (41). In this study, the torque obtained in group A implants with cortical bone was high but did not reach a sufficient level to be considered excessive.

However, when the primary stability data obtained in the block without cortical bone was analysed, no statistically significant differences were observed in the insertion torque achieved (12.38 ± 2.20 vs. 14.01 ± 2.47) due to the greater elasticity of the trabecular bone compared to the cortical bone; therefore, although the cervical region of group A implants is wider and causes greater compression, this did not translate into an increase in stability. Interestingly, there were statistically significant differences in the primary stability measured by RFA, but in this case, the results were in favour of group B implants (55.70 ± 2.68 vs. 60.25 ± 2.36). The macrodesign of implant type B and the distance between turns favouring primary stability explain this finding. Therefore, in a clinical situation of maximum demand, such as in the absence of cortical bone, group B implants show a better response. However, in the presence of cortical bone, which presents a greater Young's modulus and, therefore, less deformation capacity, implant type A, which has a wider neck, causes greater compression in the cervical region, thus achieving greater stability.

From a clinical approach, this finding is very significant, since it shows that an implant design like that of group B (Vega) provides high levels of primary stability as measured by RFA, which reduces the micromovement of the implant and increases the odds of success of the osseointegration process. This objective is also reached without increasing the insertion torque, which as explained above, should optimally be maintained at a moderate level. In the comparison of the stability measurements obtained using two different RFA devices, no statistically significant differences between Penguin RFA and Osstell IDX were observed in this study, even when the add-ons screwed into the implant (Multipeg and Smartpeg) were interchanged with each other for the measurements.

This information is very useful for the clinician, since it demonstrates that both devices can be used indistinctly, even including use of both add-ons, since the small variations presented in the results of their measurements were not statistically or clinically significant.

Recently, a clinical study was published by Becker *et al.* in which Osstell and Penguin devices were compared

(32). The results of this study were in line with ours, showing that both devices are perfectly valid for the measurement of implant stability, both primary and secondary, with no significant differences between the ISQ values obtained for each implant.

Conclusions

Based on the results obtained and despite the limitations of using an experimental *in vitro* study, the following conclusions were obtained:

1. The presence of cortical bone in the coronal zone significantly influences the primary stability of dental implants, as expressed in both insertion torque and ISQ values.
2. The design of the implant also has a statistically significant influence on implant primary stability, in terms of both insertion torque and ISQ values, although the impact depends on whether there is coronal cerclage or not.
3. A tissue-level implant design with widening in the cervical region of the implant can significantly increase the primary stability when placed in bone with cortical cerclage compared to that achieved using a bone-level implant design with a narrower cervical region.
4. The Vega implant obtains values of stability significantly superior to those of Essential Cone implants when both are placed in bone without cortex.
5. The use of two different RFA systems, such as Osstell and Penguin, causes small variations in the ISQ values but without statistical significance, demonstrating that it is not clinically relevant to suggest the use of one system over another.

References

1. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52:155-70.
2. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A. 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.
3. Glauser R, Sennerby L, Meredith N, Rée A, Lundgren A, Gottlow J, et al. Resonance frequency analysis of implants subjected to immediate or early functional occlusal loading. Successful vs. failing implants. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15:428-34.
4. Kim DS, Lee WJ, Choi SC, Lee SS, Heo MS, Huh KH, Kim TI, et al. Comparison of dental implant stabilities by impact response and resonance frequencies using artificial bone. *Med Eng Phys*. 2014;36:715-20.
5. Miyamoto I, Tsuboi Y, Wada E, Suwa H, Iizuka T. Influence of cortical bone thickness and implant length on implant stability at the time of surgery—clinical, prospective, biomechanical, and imaging study. *Bone*. 2005;37:776-80.
6. Tozum TF, Dursun E, Uysal S. Radiographic Fractal and Clinical Resonance Frequency Analyses of Posterior Mandibular Dental Implants: Their Possible Association With Mandibular Cortical Index With 12-Month Follow-up. *Implant Dent*. 2016;25:789-95.
7. Sugiura T, Yamamoto K, Horita S, Murakami K, Tsutsumi S, Kirita T. The effects of bone density and crestal cortical bone thickness on micromotion and peri-implant bone strain distribution in an immediately loaded implant: a nonlinear finite element analysis. *J Periodontol*. 2016;46:152-65.
8. I-Chiang C, Shyh-Yuan L, Ming-Chang W, Sun CW, Jiang CP. Finite element modelling of implant designs and cortical bone thickness on stress distribution in maxillary type IV bone. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*. 2014;17:516-26.
9. Sotto-Maior BS, Lima C de A, Senna PM, Camargos G de V, Del Bel Cury AA. Biomechanical evaluation of subcrestal dental implants with different bone anchorages. *Braz Oral Res*. 2014;28.pii: S1806-83242014000100235.
10. Tu MG, Hsu JT, Fuh LJ, Lin DJ, Huang HL. Effects of cortical bone thickness and implant length on bone strain and interfacial micromotion in an immediately loaded implant. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010;25:706-14.
11. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*. 2003;67:932-49.
12. Abrahamsson I, Linder E, Lang NP. Implant stability in relation to osseointegration: an experimental study in the Labrador dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20:313-18.
13. Nedir R, Bischof M, Szmukler-Moncler S, Bernard JP, Samson J. Predicting osseointegration by means of implant primary stability. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15:520-28.
14. Sjöström 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;34:45-51.
15. Swami V, Vijayaraghavan V, Swami V. Current trends to measure implant stability. *J Indian Prosthodont Soc*. 2016;16:124-30.
16. Santamaria-Arrieta G, Brizuela-Velasco A, Fernández-González FJ, Chávarri-Prado D, Chento-Valiente Y, Solaberrieta E, Diéguez-Pereira M, et al. Biomechanical evaluation of oversized drilling technique on primary implant stability measured by insertion torque and resonance frequency analysis. *J Clin Exp Dent*. 2016;8:307-11.
17. 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;7:261-67.
18. Brizuela-Velasco A, Alvarez-Arenal A, Gil-Mur FJ, Herrero-Climent M, Chávarri-Prado D, Chento-Valiente Y, Dieguez-Pereira M. 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;24:607-11.
19. Park KJ, Kwon JY, Kim SK, Heo SJ, Koak JY, Lee JH, et al. The relationship between implant stability quotient values and implant insertion variables: a clinical study. *J Oral Rehabil*. 2012;39:151-9.
20. Meredith N. Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *Int J Prosthodont*. 1998;11:491-501.
21. FA C. *Clinical Diagnosis in Glickman's Clinical Periodontology*. (W.B. Saunders, ed.). Philadelphia: 1990.
22. Brizuela-Velasco A, García-Anduaga G, Solaberrieta-Méndez E, Martín-Blanco N, Chento-Valiente Y, Álvarez-Arenal A, et al. Assessing dental implant stability using acoustic sound analysis. *Dyna*. 2016;91:1-6.
23. Schulte W, Lukas D. The Periotest method. *Int Dent J*. 1992;42:433-40.
24. Isidor F. Mobility assessment with the Periotest system in relation to histologic findings of oral implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13:377-83.
25. Salonen MA, Raustia AM, Kainulainen V, Oikarinen KS. Factors related to Periotest values in endosseal implants: a 9-year follow-up. *J Clin Periodontol*. 1997;24:272-7.
26. Drago CJ. A prospective study to assess osseointegration of dental endosseous implants with the Periotest instrument. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15:389-95.
27. Corso M, Sirota C, Fiorellini J, Rasool F, Szmukler-Moncler S, Weber HP. Clinical and radiographic evaluation of early loaded free-standing dental implants with various coatings in beagle dogs. *J Prosthet Dent*. 1999;82:428-35.

28. Tricio J, Laohapand P, van Steenberghe D, Quirynen M, Naert I. Mechanical state assessment of the implant-bone continuum: a better understanding of the Periotest method. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995;10:43-49.
29. Ohta K, Takechi M, Minami M, Shigeishi H, Hiraoka M, Nishimura M, et al. Influence of factors related to implant stability detected by wireless resonance frequency analysis device. *J Oral Rehabil.* 2010;37:131-7.
30. Sencimen M, Gulses A, Ozen J, Dergin C, Okcu KM, Ayyıldız S, et al. Early detection of alterations in the resonance frequency assessment of oral implant stability on various bone types: a clinical study. *J Oral Implantol.* 2011;37:411-9.
31. Buyukguclu G, Ozkurt-Kayahan Z, Kazazoglu E. Reliability of the Osstell Implant Stability Quotient and Penguin Resonance Frequency Analysis to Evaluate Implant Stability. *Implant Dent.* 2018;27:429-33.
32. Becker W, Hujuel P, Becker BE. Resonance frequency analysis: Comparing two clinical instruments. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018;20:308-12.
33. Ahn SJ, Leesungbok R, Lee SW, Heo YK, Kang KL. Differences in implant stability associated with various methods of preparation of the implant bed: An in vitro study. *J Prosthet Dent.* 2012;107:366-72.
34. Devlin H, Horner K, Ledgerton D. A comparison of maxillary and mandibular bone mineral densities. *J Prosthet Dent.* 1998;79:323-27.
35. Brizuela-Velasco A, Fernández-González F, Martín Blanco N, Chávarri-Prado D, Chento-Valiente Y, Dehesa-Ibarra B VJ. Accuracy of Resonance Frequency Analysis by Third Generation Osstell®. *Int J Odontostomat.* 2015;9:489-92.
36. Hsu JT, Huang HL, Chang CH, Tsai MT, Hung WC, Fuh LJ. Relationship of three-dimensional bone-to-implant contact to primary implant stability and peri-implant bone strain in immediate loading: microcomputed tomographic and in vitro analyses. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28:367-74.
37. Wang TM, Lee MS, Wang JS, Lin LD. The effect of implant design and bone quality on insertion torque, resonance frequency analysis, and insertion energy during implant placement in low or low- to medium-density bone. *Int J Prosthodont.* 2015;28:40-47.
38. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod.* 2010;36:1086-91.
39. Lee SY, Kim SJ, An HW, Kim HS, Ha DG, Ryo KH, Park KB. The effect of the thread depth on the mechanical properties of the dental implant. *J Adv Prosthodont.* 2015;7:115-21.
40. Tabassum A, Meijer GJ, Wolke JGC, Jansen JA. Influence of surgical technique and surface roughness on the primary stability of an implant in artificial bone with different cortical thickness: a laboratory study. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21:213-20.
41. Ueda M, Matsuki M, Jacobsson M, Tjellstrom A. Relationship between insertion torque and removal torque analyzed in fresh temporal bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1991;6:442-7.

Funding

This work did not receive any financial help from any public or private institution.

Ethical Approval

This work does not need ethical approval because it is an in vitro study, and does not use people or animals.

Informed consent

For this type of study, formal consent is not required.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Article

The Bone Buttress Theory: The Effect of the Mechanical Loading of Bone on the Osseointegration of Dental Implants

David Chavarri-Prado ^{1,*}, Aritza Brizuela-Velasco ¹, Ángel Álvarez-Arenal ¹, Markel Dieguez-Pereira ¹, Esteban Pérez-Pevida ^{2,3}, Iratxe Viteri-Agustín ⁴ and Alejandro Estrada-Martínez ¹

¹ Department of Surgery and Surgical Specialties, School of Medicine and Health Sciences, University of Oviedo, 33006 Oviedo, Spain; brizuela@uniovi.es (A.B.-V.); arenal@uniovi.es (Á.Á.-A.); UO254090@uniovi.es (M.D.-P.); UO261326@uniovi.es (A.E.-M.)

² Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; eperezpevida@usal.es

³ Faculty of Health Sciences, Miguel de Cervantes European University, 47012 Valladolid, Spain

⁴ Department of Pharmacology and Physiology, School of Medicine, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain; 731318@unizar.es

* Correspondence: UO254068@uniovi.es

Simple Summary: The bone, as a vertebrate support tissue, is capable of adapting its structure and function to the mechanical demands resulting from the loads that are produced during the performance of its activity. This regulatory action also occurs during the healing processes of a fracture. The purpose of this study was to determine to what extent a dynamic load was capable of modulating the bone healing response around a titanium implant. The study was carried out on experimental rabbits, to which dental implants were placed in the tibiae and there were two test groups, one in which they did not undergo exercise during healing period and another that ran daily during this process on a treadmill. The trial results showed an improvement in the osseointegration process of the implant in the group in which it was subjected to load. The importance of these results is that it opens the door to a better understanding of the mechanisms that can modulate bone healing, especially around dental implants, supporting implant loading protocols that are based on efficiency.



Citation: Chavarri-Prado, D.; Brizuela-Velasco, A.; Álvarez-Arenal, Á.; Dieguez-Pereira, M.; Pérez-Pevida, E.; Viteri-Agustín, I.; Estrada-Martínez, A. The Bone Buttress Theory: The Effect of the Mechanical Loading of Bone on the Osseointegration of Dental Implants. *Biology* **2021**, *10*, 12. <https://doi.org/10.3390/biology10010012>

Received: 24 November 2020

Accepted: 21 December 2020

Published: 28 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Objectives: To determine the effect of mechanical loading of bone on the stability and histomorphometric variables of the osseointegration of dental implants using an experimental test in an animal model. Materials and Methods: A total of 4 human implants were placed in both tibiae of 10 New Zealand rabbits ($n = 40$). A 6-week osseointegration was considered, and the rabbits were randomly assigned to two groups: Group A (Test group) included 5 rabbits that ran on a treadmill for 20 min daily during the osseointegration period; Group B (Controls) included the other 5 that were housed conventionally. The monitored variables were related to the primary and secondary stability of the dental implants (implant stability quotient—ISQ), vertical bone growth, bone to implant contact (BIC), area of regenerated bone and the percentage of immature matrix. Results: The results of the study show a greater vertical bone growth (Group A 1.26 ± 0.48 mm, Group B 0.32 ± 0.47 mm, $p < 0.001$), higher ISQ values (Group A 11.25 ± 6.10 ISQ, 15.73%; Group B 5.80 ± 5.97 ISQ, 7.99%, $p = 0.006$) and a higher BIC (Group A 19.37%, Group B 23.60%, $p = 0.0058$) for implants in the test group, with statistically significant differences. A higher percentage of immature bone matrix was observed for implants in the control group (20.68 ± 9.53) than those in the test group (15.38 ± 8.84) ($p = 0.108$). A larger area of regenerated bone was also observed for the test implants (Group A 280.50 ± 125.40 mm², Group B 228.00 ± 141.40 mm²), but it was not statistically significant ($p = 0.121$). Conclusions: The mechanical loading of bone improves the stability and the histomorphometric variables of the osseointegration of dental implants.

Keywords: implant stability; resonance frequency analysis; osseointegration; immediate loading; BIC

1. Introduction

The osseointegration of dental implants has often been described as a model of primary or direct healing of a bone fracture. Mechanical stability and a favourable biological environment are essential for the success of both processes [1].

Mechanical stability refers to the fact that an excessive force at the fracture edges or between the osteoid apposition line and the titanium surface during osseointegration of a dental implant can lead to successive ruptures of the newly formed capillaries and impair the repair process mediated by fibrous tissue [2].

A study recently published by the same research group that conducted this study showed that the use of integrated dental implants and those that were immediately loaded after surgical placement through masticatory loading increased their stability [3]. These results suggest that positive functional results can be expected during the integration of implants. Several theoretical studies related to traumatology report that dynamic loading during the bone healing process can increase the levels of mesenchymal stem cells (MSC) in the endosteum, chondrogenic growth factors in the periosteum and cortical areas around the callus of the fracture [4].

There is sufficient scientific evidence in the literature to support the success and survival of immediately loaded dental implants, including single implants that do not have the mechanical advantage of immobilisation and immediate implants in post-extraction sites that have their lateral stability compromised by a gap between them and the post-extraction alveolar socket [5–7].

However, successful osseointegration is not enough, since several studies have already shown that bone formation can be stimulated when certain forces are applied to the implant during integration. This leads to an increase in the bone-to-implant contact (BIC) ratio or the amount of mineralised bone at the bone-to-implant interface [8–12]. Moreover, immediate loading seems to increase alveolar bone neoformation on the surface of the implants [12]. Although the underlying cellular or molecular mechanisms are still not clear, some studies indicate that there is a dose-dependent relationship between the magnitude of the applied force and the production and rearrangement of mineralised material and bone tissue [13].

Finally, the healing process is complex and multifaceted. The biomechanical stimulus, consisting of the application of a force to the bone, can increase the density, size and interconnectivity of the bone trabeculae. Most importantly, it can significantly alter their three-dimensional structure, and they can assume an arrangement that is functionally oriented to the direction of the received load [14–16]. In this regard, Lanyon has already demonstrated that the main orientation of the bone trabeculae coincides with the main directions of the force, which could be traction or compression, to which the bone is subjected [17,18]. Hayes and Snyder also demonstrated through a finite element analysis that the orientation of the bone trabeculae is strongly correlated with the main directions of the force that the bone receives [19]. Both studies support the theory of the alignment of the bone trabeculae with the main directions of the force proposed by Wolff in the 19th century [20,21]; the theory can be explained by the concept of mechanotransduction. The osteocytes act as pressure sensors, and they sense the alterations in the load received by the bone. Once the mechanical stimulus is sensed, the osteocytes transform this corresponding signal into an intracellular biochemical response and transmit it to the osteoblasts and osteoclasts. The osteoblasts and osteoclasts, in turn, produce or eliminate bone, respectively, depending on the demand [22]. The transmission of this information involves a multitude of autocrine and paracrine factors, but the information is transmitted through a dendritic network that is similar to the neural network of the brain [23]. Since the trabecular bone is an orthotropic material, the elastic energy applied to the material by an arbitrary force minimises when it is aligned with the main direction of the applied force [24]. The load acting during the early phase of osseointegration increases the production of transverse collagen fibres and the mineral density. The studies by Traini et al. showed a greater organisation of collagen fibres around loaded implants as well as a higher number of

transverse fibres perpendicular to the implant axis [25–27]. This demonstrates that the immediate loading protocol is beneficial; loaded implants have a better organisation of the peri-implant bone than unloaded implants. The authors state that the quantity and orientation of the collagen fibres surrounding the implant can serve as a reliable measure of the quality of osseointegration [26,27].

In clinical practice, this can mean that immediate or early loading protocols in oral implantology are not only feasible and predictable [10–12], but they can also be favourable and beneficial for the arrangement and structuring of the bone around the implant depending on the load [9,13–16]. As a result, conventional loading protocols -in which the implant is restored a few months after placement, once it is osseointegrated, can condemn the bone to suffer a phenomenon of later bone remodelling, to redirect the bone in relation to the received load relying on inflammatory processes, that not always will be respectful with the maintenance of the peri implant marginal bone [3].

However, there is currently insufficient scientific evidence on the effect of a biomechanical stimulus on the peri-implant bone during osseointegration. For this reason, the general objective of our study was to determine the outcome of mechanical loading after implant placement in an experimental animal model using histological and histomorphometric variables. The specific objectives were to analyse the effect of mechanical loading on the biological stability of implants, determine the effect of mechanical loading on the histological characteristics of the newformed peri-implant bone and the bone-to-implant contact ratio, and compare the patterns that emerge in the three-dimensional arrangement of peri-implant bone tissue according to the established loading protocol.

2. Material & Methods

The experiment focused on a rabbit tibia study that involved implant placement to compare the arrangement and characteristics of peri-implant bone tissue formed during osseointegration in animals that had and had not received biomechanical stimuli.

2.1. Reporting of In Vivo Experiments

This study used the guidelines of “Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments” (ARRIVE) for reporting animal in vivo experiments to facilitate the reproducibility and adequate communication of the findings [28].

2.2. Specimens

This study involved 10 mature male New Zealand Rabbits, with each weighing 3.5–4 kg. Ethical approval was obtained from the Ethics Committee for Animal Research of the University of Oviedo PROAE with the authorisation code of 7/2018 on 23rd April 2018 (Oviedo, Asturias, Spain).

2.3. Adaptation Phase

Before the surgery, the 10 animals completed a two-week adaptation phase. This was mainly aimed at adapting them to the treadmill on which the 5 test animals would run during the osseointegration phase [29]. A treadmill (MC100, Fitfiu Fitness, Valls, Spain) specially adapted for this purpose was used, and it was coupled by a metal cage open at the top and the bottom to allow the rabbit to run without escaping. In the first week, the rabbits remained on the turned-off treadmill without movement for 10 min a day. In the second week, they remained on the moving treadmill for 10 min at the minimum speed (10 m/s) to allow them to gradually adapt to the treadmill before surgery and reduce post-operative stress.

(10 m/s) to allow them to gradually adapt to the treadmill before surgery and reduce post operative stress.

2.4. Surgical Procedure

The rabbits underwent general anaesthesia for the surgical procedures; an intramuscular mixture of dexmedetomidine (Dexdomitor; Eucuphar, Barcelona, Spain), ketamine (Ketamidol; Karizoo, Barcelona, Spain) and buprenorphine (Bupag; Richter Farma, Wells, Austria) was used for induction. Anaesthetic maintenance was performed by inhalation with isoflurane (Isoflo, Zoetis Madrid, Spain) at a fixed concentration of 1–2%. In addition, artocaine hydrochloride with epinephrine 0.01 mg/mL was administered via an infiltrative route in the operated area (Ultrasain Normon Laboratories, Madrid, Spain) infiltrative route in the operated area. A single incision was made on the inside of each tibia in all animals. A full-thickness flap was opened, and two 3.0 × 8 mm Klockner Vega implants (Soadco, Escaldes Gordany, Andorra) were placed in the medial portion of each tibia in the area closest to the epiphysis. The implants were placed according to the full-thickness flap technique recommended by the manufacturer, with identical anchorage and distance of 6 mm between both implants (Figure 1A,B). The total implant sample size was 40 (n = 40).

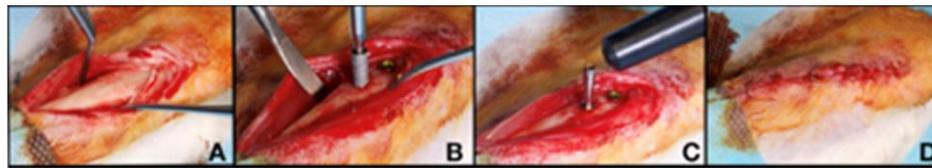


Figure 1. Surgical procedure. Incision and full-thickness flap (A). Placement of two 3.0 × 8 mm Klockner Vega implants in each tibia (B). Measurement of primary stability (ISQ) using a Penguin RFA device (C). Suture of the wound by tissue planes and primary closure over the healing caps (D).

2.5. Primary Stability Measurements

Primary stability was measured by two methods: Insertion torque, expressed in Nm, using the torque wrench of the Klockner Vega surgical system (Soadco, Escaldes Gordany, Andorra). Resonance frequency analysis, expressed in ISQ, using a Penguin RFA device (Integration Diagnostics Sweden AB, Gothenburg, Sweden) and multi-peg measuring probes specific for 3-mm Klockner VEGA implants (Figure 1C).

2.6. Healing Caps

A 2-mm high healing abutment with laser markings after every 0.5 mm was manufactured specifically for this study (Soadco, Escaldes Gordany, Andorra) (Figure 2). This allowed the quantification of the potential vertical bone growth during osseointegration and the comparison of the groups. After placing the implants, the healing caps were placed and left submerged. A flat suture was made with simple stitches using 90% glycolide and 10% L-lactide 4/0 resorbable suture (Vicryl 4/0 Ethicon, Johnson & Johnson International; Somerville, NJ, USA) to facilitate adequate primary wound closure (Figure 1D).

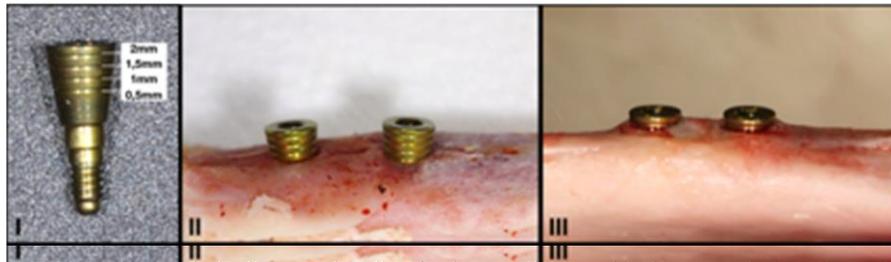


Figure 2. (I) Photo of one of the healing caps that allow for the quantification of the bone growth above the implant platform. (II) Photo of two of the healing caps that all Group A rabbits had attached to the bone. (III) Photo of the bone above the implant platform of the control group (Group B) following the osteotomy. (IV) Photo of the bone above the implant platform of the test group (Group A) following the osteotomy. The difference in height between the height of bone growth in the two groups is visible.

2.7. Randomisation of Samples

2.7. Randomisation of Samples

Immediately after surgery, the 10 rabbits were allocated to the test group (Group A) or control group (Group B) using permuted blocks randomisation (5 blocks of 2 elements). The control group (Group B) using permuted blocks randomisation (5 blocks of 2 elements). This randomisation was carried out by an independent observer who was unaware of the objectives of the study.

2.8. Biomechanical Stimulus

2.8. Biomechanical Stimulus

From the day after surgery, the 5 rabbits assigned to the test group (Group A) started performing daily physical exercise on the treadmill for 6 weeks, while the osseointegration was ongoing (Figure 3). The run lasted 5 min a day initially before progressively increasing to two daily sessions of 10 min during the last 2 weeks in the meantime, the summation of the two sessions was 20 min. The control group (Group B) was kept in a cage during the 6 weeks and did not have any physical exercise. The standard housing protocol, with ad libitum feeding and 12 h day/night light cycles.



Figure 3. Specimen of group A exercising on the treadmill.
 Figure 3. Specimen of group A exercising on the treadmill.

2.9. Sacrifice

The rabbits were sedated with dexmedetomidine (Dexdomitor; Ecuphar, Barcelona, Spain) and diazepam (Valium, Roche Farma, Madrid, Spain) six weeks after the implant placement. They were sacrificed by intravenous injection of sodium pentobarbital at 100 mg/kg.

Subsequently, a full-thickness flap was created in each tibia for implant exposure, and photos were taken for the quantitative analysis of the vertical bone growth above the implants. As bone growth was not homogeneous around each implant, two measurements were taken: one at the point of minimum growth and another at the point of maximum growth. Next, the healing caps were removed, and the implant stability was measured again using Penguin RFA. Following this, the tibiae were cut, and the bone blocks were obtained with the implants included for the histological study.

2.10. Histological Processing

The samples were dehydrated by immersion in ethanol and embedded, without decalcification, in liquid methyl methacrylate for 15 days at 4 °C with agitation. Following this, they were kept at 32 °C for 6 days. Once polymerised, the samples were sectioned using a low-speed microtome with a diamond disc (Isomet, Bueher® lake bluff, Dusseldorf, Germany) parallel to the longitudinal axis of the titanium implant to obtain central sections. These sections were stained using Stevenel's Blue histological technique, in which the mineralised bone was stained red. An optical microscope (Nikon Eclipse 90i, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) was used for the histological assessment of the obtained sections.

2.11. Histomorphometrical Analysis

The histomorphometric analysis was performed by an independent observer who was unaware of the case/control assignment using MetaMorph Meta Imaging Series 6.1 (Molecular Devices, CA, USA). The following parameters were analysed:

- % BIC: percentage of bone-to-implant contact in the region of interest (ROI). The BIC was analysed exclusively in the coronal area of the implant, specifically in the area surrounding its neck. The apical anchorage zone was not included given that its relationship with the implant was more heterogeneous, and, unlike the coronal area, it was impossible to control during surgery.
- New bone formation (mm²): the amount of newformed bone on the surface of the implant.
- % of immature bone matrix: the proportion of the area of newformed bone that is immature, with disorganised collagen fibres.

2.12. Statistical Analysis

The continuous variables were described using the mean, standard deviation and the number of cases. After confirming their lack of normality using the Anderson–Darling test, the statistically significant differences between the group medians were determined using the non-parametric Kruskal–Wallis test. Finally, the linear correlation between the variables was measured using Pearson's correlation coefficient.

3. Results

All the implant sites healed uneventfully, and all the implants were correctly osseointegrated, resulting in a 100% survival rate.

3.1. Vertical Bone Growth

Several implants showed vertical bone growth above the implant platform. However, this growth was uneven in both groups (Figure 3). The vertical bone growth was 1.26 ± 0.48 mm in the test implants ($n = 20$) and 0.32 ± 0.47 mm in the control implants ($n = 20$); the difference was statistically significant ($p < 0.001$; Table 1).

Table 1. Table of descriptive statistics (mean and SD) of the primary stability values measured by insertion torque and RFA, as well as the secondary stability results and the increase in implant stability quotient (ISQ) values during the 6 weeks of the experiment.

Measured Parameter	Group A (Test) Mean (SD)	Group B (Control) Mean (SD)	p Value
Torque (N/cm)	27.00 (10.05)	23 (10.05)	$p = 0.279$
Primary stability (ISQ)	71.50 (3.09)	72.53 (3.67)	$p = 0.262$
Secondary stability (ISQ)	82.75 (4.91)	78.33 (3.68)	$p = 0.008$
ISQ increase	11.5 (6.10)	5.80 (5.97)	$p = 0.006$

3.2. Implant Stability

Table 2 shows the primary stability values measured by insertion torque and RFA on the day of implant placement and the secondary stability ISQ values measured on the day of sacrifice after 6 weeks.

Table 2. Table of descriptive statistics (mean and SD) and statistical significance of the differences between the vertical bone growths (mm), percentages of the bone to implant contact (%), areas of regenerated bone (mm²) and immature bone matrix (%) of the groups.

Measured Parameter	Group A (Test) Mean (SD)	Group B (Control) Mean (SD)	p Value
Vertical bone growth (mm)	1.26 (0.47)	0.32 (0.46)	$p \leq 0.01$
Bone to implant contact (%)	25.14 (5.24)	18.87 (4.45)	$p \leq 0.01$
Areas of regenerated bone (%)	280.50 (125.40)	228.00 (141.40)	$p = 0.121$
Immature bone matrix (%)	15.38 (8.84)	20.68 (9.53)	$p \leq 0.01$

There were no statistically significant differences between the primary stability values of both groups based on the insertion torque (group A 27.00 ± 10.13 N/cm; group B 23.0 ± 10.05 N/cm; $p = 0.279$) or the ISQ values (group A 71.50 ± 3.09 ISQ; group B 72.53 ± 3.67 ISQ; $p = 0.262$). Moreover, there was no statistically significant correlation between the insertion torque values and the initial ISQ values (Pearson's Coefficient = 0.00). There was a statistically significant increase in the stability of the implants in both the test and control groups during the osseointegration; the ISQ values of all the implants were higher at the time of sacrifice than at the time of placement (group A 82.75 ± 4.91 ISQ; group B 78.33 ± 3.68 ISQ; $p = 0.008$). However, this increase was statistically significantly higher in the test implant group than in the control implant group (Group A 11.25 ± 6.10 ISQ, 15.73%; Group B 5.80 ± 5.97 ISQ, 7.99%; $p = 0.006$).

3.3. Bone to Implant Contact

As shown in Table 2, the mean BIC values were higher in group A ($25.14 \pm 5.24\%$) than in group B ($18.87 \pm 4.45\%$), and the differences were statistically significant ($p < 0.01$).

On the other hand, the statistical analysis demonstrated that there is a direct correlation between the final ISQ and the BIC values, although without a strong association (Pearson's Coefficient = 0.528).

3.4. Bone Neoformation

Table 2 shows the results of the measurement of the area occupied by newformed bone on the surface of each implant, as well as the percentage of immature bone matrix.

The mean area of bone neoformation was 280.50 ± 25.42 mm² in group A and 228.00 ± 22.40 mm² in group B. Although the difference between the two groups was not statistically significant (p > 0.05), there was a trend of greater bone formation around the implants in the test group than in the control group. This shows a direct relationship between bone neoformation and BIC (Pearson's Correlation Coefficient = 0.329). Furthermore, the percentage of immature bone matrix was significantly lower in group A (15.78%) than in group B (20.68%) (p = 0.008) and it showed a statistical relationship with BIC (Pearson's Correlation Coefficient = 0.498). These findings indicate a lower level of number of collagen fibers in the back of the implant in the test group than in the control group. The results of the analysis of the stability of the implant on the histomorphometric variables above are shown in Figure 4.

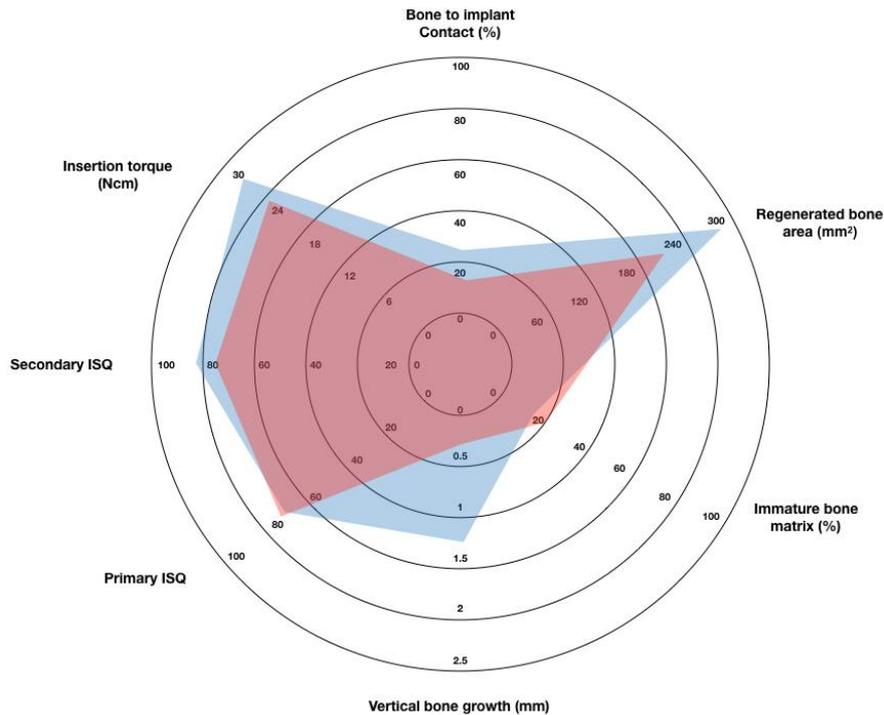


Figure 4. Graphic representation of the analysis of stability and histomorphometric variables. Blue area represents Group A (test) and red area represents Group B (control).

3.5. Bone Disposition

The images of the histological sections obtained by microscopy (10×) showed a different orientation of the peri-implant bone matrix in the cases and controls (Figure 5A,B). The calcified collagen fibres in the test implants were predominantly arranged perpendicular to the longitudinal axis of the implant on the crest module and at the level of the microgrooves (Figure 5C). In the controls, the fibres were arranged parallel to the implant

of the microgrooves (Figure 5C). In the controls, the fibres were arranged parallel to the implant (Figure 5D) and the newformed bone showed changes in the matrix deposits. These deposits were more disorganised, and they had darker aggregates that ended on the bone surface with a trabecular arrangement involving more vascular cavities of smaller size. The osteocytes were also surrounded by more immature spaces.

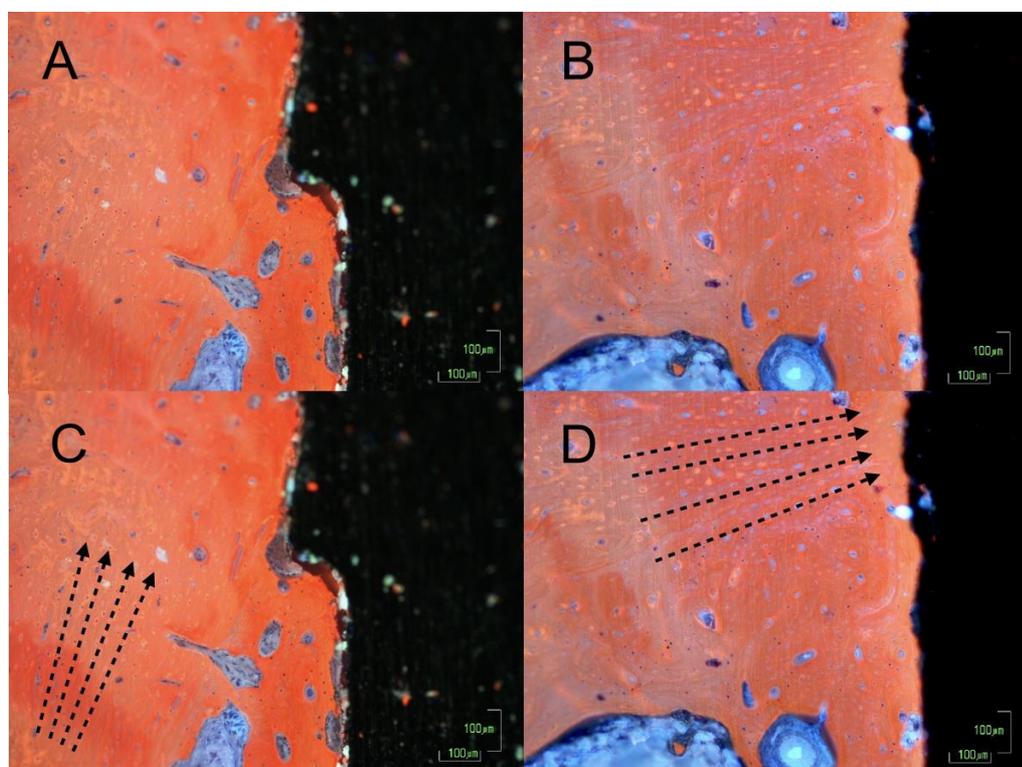


Figure 5. Optical microscopy (10×) image of the control (A) and the test (B). The black arrows point the parallel orientation of the matrix with respect to the implant in the control group (C) and the perpendicular orientation in the test group (D).

4. Discussion

The present study investigated the histological and histomorphometric findings of the bone around dental implants placed in rabbit tibiae and subjected to mechanical loading, as well as their biological stability during osseointegration. Rabbits were used for the experimental models since there was extensive literature on them, the authors had experience handling them and they are the smallest experimental animals that allow the placement of human dental implants. According to Sedlin and co-workers, humans and other mammals present similar biological responses to biomechanical stimuli, and the rabbit cortical bone remodels three times faster than that of humans. Therefore, the experimental period of 6 weeks used in this study would correspond to a period of 18 weeks in the human body [30].

It should be noted that the methodology of the study, involving the use of a treadmill to expose the animals to daily physical exercise, has been described in previously published studies [29,31–33]. It should be recognised that the loading model of this experimental setting may differ on the masticatory biomechanics, both in magnitude and the direction

of forces and the mechanisms of transfer of the force to the peri-implant marginal bone. Despite the differences, the run on the treadmill of the test group can be biomechanically described as dynamic and based on successive impact loads, in the same way some authors describe mastication [34]. The loading time of up to 20 min per day was similar to the daily load time of the masticatory forces, which some authors consider to be 20–30 min [35]. In summary, the objective for the model of this study was to produce a biomechanical stimulus to be exerted on the bone surrounding the implants, similar to that induced by mastication and exerted on the maxillary bones and the implants they contain.

The loading model used in this study differs from others in which static loading was used. [36,37]. This is relevant since some studies have shown that the formation of peri-implant bone is only influenced by dynamic loads and not static loads [38,39].

Furthermore, a 2014 study by JingYun et al. demonstrated that the implant did not respond to a design identical to that of humans, but it incorporated the loading device and created a direct exit for the implant through the apical cortex, in addition to a bicortical anchorage. This placement of the implant can substantially modify the load transfer between the implant and the bone [37].

On the other hand, the study by Duyck et al. placed 40 implants in the tibiae of 8 rabbits [40]. In some of these implants, the authors applied dynamic load cycles via a transverse force of 14.7 N at a frequency of 1 Hz for 2 weeks. They applied 90 load cycles per day in the first week and 270 cycles per day in the second week. However, it seems clear that the direction of the applied load, which was completely perpendicular to the implant axis, is not related to the direction of the occlusal forces that transmit the load on the implants during mastication. This is an important problem as the compression forces are anabolic, whereas the torsional and shear deformations have no effect [41] or are negatively correlated with bone growth toward porous structures [42].

Furthermore, the number of load cycles per day does not correspond to the number of masticatory cycles of an average patient [43–45]. Therefore, the 2 weeks of study could be insufficient for complete osseointegration as it would be equivalent to 6 weeks in humans. These reasons may explain why, unlike the results of our study, the authors found no significant differences between the loaded test groups and unloaded control groups.

Finally, in other studies, the authors applied a dynamic load on the implants for a period of 3 weeks, but only twice a week. This does not correctly reproduce the load times for which the implants are exposed during mastication. As reported by Duyck, this can fall below the stimulation threshold. Furthermore, these load cycles were applied after the osseointegration, which mimics a delayed loading protocol and not an immediate loading as applied in our study [46–48].

The first finding of this study, following the analysis of the results, was the confirmation of a greater bone overgrowth for the implants that had received biomechanical stimuli. This overgrowth was caused by the detachment of the periosteum and its subsequent replacement over the healing caps; it helped to maintain the created subperiosteal space and allowed it to be filled with a blood clot, which is similar to the “Tent Pole” bone regeneration technique [49]. However, there were statistically significant differences between the amounts of bone overgrowth in the two groups, which indicates that the biomechanical stimuli caused greater bone remodelling with intense osteoblastic activity in the implants of the test group. This resulted in the formation of a greater volume of bone. These results support Pauwels’ theory, which in 1965 argued that bone is capable of adjustments to increasing or decreasing mechanical stimuli by adapting the volumetric dimensions of its architecture [13]. Our results are similar to those of the study by Wiskott et al. that used a similar model but applied direct and dynamic load cycles on the implants after osseointegration [13]. This study has similar limitations to those previously mentioned for the study by Duyck et al., namely the transversal application of force and the insufficient number of cycles. However, the authors observed that there was a statistically significant increase in the cortical bone volume in the inter-implant region following the application of the load. According to the authors, the response of the cortical bone to the applied stress

consisted of the rearrangement of its structure and an increase in its mass [13]. On the other hand, Liu et al. placed 107 implants in 45 patients and observed a statistically significant bone gain 12, 24 and 36 months after loading [50].

The results of the present study also show a statistically significant increase in ISQ implant stability values, which were measured by resonance frequency analysis during osseointegration.

However, this increase was higher in the implants of the test group, which demonstrates the effect of biomechanical stimuli on the biological stability of the dental implants. The results are consistent with those obtained by our research group in a previously published retrospective clinical study [3]. That study showed that implant loading promotes implant stability measured by RFA. With a total sample size of 93, the measurement of the stability of rehabilitated implants with immediate loading ($n = 28$) and delayed loading ($n = 65$) showed a significantly higher increase in ISQ values the former than in the latter. Moreover, it was also observed that the greatest increase in stability occurred during the osseointegration (first weeks) in the immediate loading group and after prosthetic rehabilitation in the delayed loading group (after 12 weeks). Similar results were obtained by Akoglan et al. in a prospective clinical study involving 39 single implants in the posterior maxilla of 39 patients [51]. In this study, the implants rehabilitated by immediate or early loading protocols had significantly higher ISQ values during osseointegration than the delayed loading implants, in addition to the higher bone density in the peri-implant area. Other published studies also measured implant stability using RFA at prosthesis insertion as well as after 6 and/or 12 months of loading, although they did not share our objective, [52,53]. The results of these studies also show that implant stability increases after functional loading.

Regarding histomorphometry, our results showed that the biomechanical stimulation of the peri-implant bone significantly increased the percentage of contact between the bone and the implant in the test group ($p < 0.01$). This had already been extensively demonstrated in previous studies carried out in animal models, and it can be understood as osseointegration improvement under loading [9,11,12,54]. However, it should be noted that other authors did not find statistically significant differences between the loaded and unloaded implants [10,27,55].

A study by Liñares et al. placed 24 implants in the mandible of 8 minipigs to compare the histological differences between a group of rehabilitated implants with immediate loading and another group rehabilitated with delayed loading. The results indicated the absence of statistically significant differences between the BICs of both groups. Unlike in our study, all implants were loaded (immediate or delayed), and it is not possible to determine whether a hypothetical unloaded control group would have obtained lower BIC values [56].

In this study, the effect of applying loading on hard tissue formation around the implants was evident, and there were significant differences between the amounts of newformed bone on the implant surface (group A 280.50 ± 125.40 ; group B 228.00 ± 141.40 ; $p < 0.05$). This shows that the biomechanical stimulation of the peri-implant bone has a positive effect on the osseointegration process, since it activates the cellular and molecular mechanisms implicated in bone remodelling. This finding is consistent with data obtained in other histomorphometric studies carried out in different animal models [36,37].

Although the results show statistically significant higher ISQ and BIC values for the implants in the control group, a significant correlation between both values after osseointegration was not found. This is a controversial issue, but our results agree with those of previous studies carried out in animal models to elucidate this question [57–60]. In its essence, resonance frequency analysis is based on the natural frequency of vibration of a structure (in this case, the implant within the bone), and it is related to the stiffness of the peri-implant marginal bone, inversely correlating with the micromovement during loading [61]. A higher BIC does not necessarily represent greater rigidity or a correct

5. Conclusions

The results of this animal study demonstrate that functional loading provides biomechanical stimuli that influence the osseointegration of implants at various levels:

Greater secondary stability of loaded implants.

Greater bone growth and greater bone-to-implant contact ratio.

Greater surface area of the newformed bone on the implant surface, with a higher percentage of mature bone matrix around it.

Better arrangement of collagen fibres and bone trabeculae for a favourable load dissipation on the supporting surface.

Author Contributions: All the authors contributed substantially to the work. Methodology, D.C.-P., M.D.-P.; investigation, A.E.-M.; data curation, I.V.-A.; writing-review and editing, A.B.-V., E.P.-P.; supervision and project administration, Á.Á.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the the Ethics Committee for Animal Research of the University of Oviedo PROAE with the authorisation code of 7/2018 on 23rd April 2018 (Oviedo, Asturias, Spain).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data available in a publicly accessible repository that does not issue DOIs.

Acknowledgments: The authors are grateful to SOADCO S.L. company for providing the Implants (3.0 × 8 mm KlocknerVega), and the customized healing abutments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Schenk, R.K.; Buser, D. Osseointegration: A reality. *Periodontology 2000* **1998**, *17*, 22–35. [[CrossRef](#)]
2. Rhineland, F.W. Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1974**, *105*, 34–81. [[CrossRef](#)]
3. Brizuela-Velasco, A.; Chávarri-Prado, D. The functional loading of implants increases their stability: A retrospective clinical study. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2019**, *21*, 122–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ghimire, S.; Miramini, S.; Richardson, M.; Mendis, P.; Zhang, L. Role of dynamic loading on early stage of bone fracture healing. *Ann. Biomed. Eng.* **2018**, *46*, 1768–1784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sanz-Sanchez, L.; Sanz-Martin, I.; Figuero, E.; Sanz, M. Clinical efficacy of immediate implant loading protocols compared to conventional loading depending on the type of the restoration: A systematic review. *Clin. Oral Implant. Res.* **2015**, *26*, 964–982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gallucci, G.O.; Hamilton, A.; Zhou, W.; Buser, D.; Chen, S. Implant placement and loading protocols in partially edentulous patients: A systematic review. *Clin. Oral Implant. Res.* **2018**, *29*, 106–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Norton, M.R. The influence of insertion torque on the survival of immediately placed and restored single-tooth implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2011**, *26*, 1333–1343.
8. Gotfredsen, K.; Berglundh, T.; Lindhe, J. Bone reactions adjacent to titanium implants subjected to static load. A study in the dog (I). *Clin. Oral Implant. Res.* **2001**, *12*, 1–8. [[CrossRef](#)]
9. Moon, S.; Kim, S.; Lim, S.; Ong, J.L. Histologic and histomorphometric evaluation of early and immediately loaded implants in the dog mandible. *Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *15*, 1122–1127. [[CrossRef](#)]
10. Podaropoulos, L.; Veis, A.A. Bone reactions around dental implants subjected to progressive static load: An experimental study in dogs. *Clin. Oral Implant. Res.* **2016**, *27*, 910–917. [[CrossRef](#)]
11. Romanos, G.E.; Toh, C.G.; Siar, C.H.; Swaminathan, D. Histologic and histomorphometric evaluation of peri-implant bone subjected to immediate loading: An experimental study with *Macaca fascicularis*. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* **2002**, *17*, 44–51.
12. Romanos, G.E.; Toh, C.G.; Siar, C.H.; Wicht, H.; Yacoob, H.; Nentwig, G.H. Bone-implant interface around titanium implants under different loading conditions: A histomorphometrical analysis in the *Macaca fascicularis* monkey. *J. Periodontol.* **2003**, *74*, 1483–1490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wiskott, H.W.; Cugnoni, J.; Scherrer, S.S.; Ammann, P.; Botsis, J.; Belsler, U.C. Bone reactions to controlled loading of endosseous implants: A pilot study. *Clin. Oral Implant. Res.* **2008**, *19*, 1093–1102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Takuma, M.; Harada, S.; Kurokawa, F.; Takashima, F.; Miyauchi, S.; Maruyama, T. Experimental study on the functional adaptation to aluminum oxide, hydroxyapatite and titanium implants. *J. Osaka Univ. Dent. Sch.* **1987**, *27*, 111–121.

15. Deporter, D.A.; Watson, P.A.; Pilliar, R.M.; Howley, T.P.; Winslow, J.A. Histological evaluation of a functional endosseous, porous-surfaced, titanium alloy dental implant system in the dog. *J. Dent. Res.* **1988**, *67*, 1190–1195. [[CrossRef](#)]
16. Trisi, P.; Rebaudi, A. Peri-implant bone reaction to immediate, early, and delayed orthodontic loading in humans. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* **2005**, *25*, 317–329.
17. Lanyon, L.E. Analysis of surface bone strain in the calcaneus of sheep during normal locomotion. Strain analysis of the calcaneus. *J. Biomech.* **1973**, *6*, 41–49. [[CrossRef](#)]
18. Lanyon, L.E. Experimental support for the trajectorial theory of bone structure. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1974**, *56*, 160–166.
19. Hayes, W.; Snyder, B. Toward a quantitative formulation of Wolff's law in trabecular bone. In *Mechanical Properties of Bone*; Cowin, S., Ed.; American Society of Mechanical Engineers: New York, NY, USA, 1981; pp. 43–68.
20. Wolff, J. On the significance of the architecture of the spongy substance for the question of bone growth. *Centralblatt für die Meichinschen Wissenschaften* **1869**, *54*, 849–851.
21. Wolff, J. The classic: On the significance of the architecture of the spongy substance for the question of bone growth: A preliminary publication. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2011**, *469*, 3077–3078. [[CrossRef](#)]
22. Martin, R.B.; Burr, D.B.; Sharkey, N.A.; Fyhrie, D.P. *Skeletal Tissue Mechanics. Skeletal Tissue Mechanics*; Springer: New York, NY, USA, 2015.
23. Turner, C.H.; Robling, A.G.; Duncan, R.L.; Burr, D.B. Do bone cells behave like a neuronal network? *Calcif. Tissue Int.* **2002**, *70*, 435–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fyhrie, D.P.; Carter, D.R. A unifying principle relating stress to trabecular bone morphology. *J. Orthop. Res.* **1986**, *4*, 304–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Traini, T.; Degidi, M.; Caputi, S.; Strocchi, R.; Di Iorio, D.; Piattelli, A. Collagen fiber orientation in human peri-implant bone around immediately loaded and unloaded titanium dental implants. *J. Periodontol.* **2005**, *76*, 83–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Neugebauer, J.; Traini, T.; Thams, U.; Piattelli, A.; Zoller, J.E. Peri-implant bone organization under immediate loading state. Circularly polarized light analyses: A minipig study. *J. Periodontol.* **2006**, *77*, 152–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Traini, T.; Neugebauer, J.; Thams, U.; Zöller, J.E. Peri-Implant Bone Organization under Immediate Loading Conditions: Collagen Fiber Orientation and Mineral Density Analyses in the Minipig Model. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **2009**, *11*, 41–51. [[CrossRef](#)]
28. Kilkenny, C.; Browne, W.J.; Cuthill, I.C.; Emerson, M.; Altman, D.G. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2010**, *1*, 94–99. [[CrossRef](#)]
29. Seo, D.Y.; Lee, S.R.; Kim, N. Humanized animal exercise model for clinical implication. *Pflugers Arch.* **2014**, *466*, 1673–1687. [[CrossRef](#)]
30. Sedlin, E.D. A rheologic model for cortical bone. A study of the physical properties of human femoral samples. *Acta Orthop. Scand.* **1965**, *83*, 1–77. [[CrossRef](#)]
31. Hexeberg, E.; Biology, C. Effects of endurance training on left ventricular performance: A study in anaesthetized rabbits. *Acta Physiol. Scand.* **1995**, *154*, 479–488. [[CrossRef](#)]
32. Gaustad, S.E.; Rolim, N.; Wisløff, U. A valid and reproducible protocol for testing maximal oxygen uptake in rabbits. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **2010**, *17*, 83–88. [[CrossRef](#)]
33. Gao, L.; Wang, W.; Liu, D.; Zucker, I.H. Exercise training normalizes sympathetic outflow by central antioxidant mechanisms in rabbits with pacing-induced chronic heart failure. *Circulation* **2007**, *115*, 3095–3102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Misch, C. *Implantología Contemporánea*, 2nd ed.; Elsevier: Barcelona, Spain, 2009.
35. Choy, E.; Kydd, W.L. Bite force duration: A diagnostic procedure for mandibular dysfunction. *J. Prosthet. Dent.* **1988**, *60*, 365–368. [[CrossRef](#)]
36. Vandamme, K.; Naert, I.; Geris, L.; Vander Sloten, J.; Puers, R.; Duyck, J. The effect of micro-motion on the tissue response around immediately loaded roughened titanium implants in the rabbit. *Eur. J. Oral Sci.* **2007**, *115*, 21–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Jingyun, H.A.N.; Jianxia, H.O.U.; Gang, Z.; Chao, W.; Yubo, F.A.N. A histological and biomechanical study of bone stress and bone remodeling around immediately loaded implants. *Sci. China Life Sci.* **2014**, *57*, 618–626.
38. Rubin, C.T.; Lanyon, L.E. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J. Bone Joint Surg. Am.* **1984**, *66*, 397–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Hert, J. Acceleration of the growth after decrease of load on epiphyseal plates by means of spring distractors. *Folia Morphol.* **1969**, *17*, 194–203.
40. Duyck, J.; Rønold, H.J.; Van Oosterwyck, H.; Naert, I.; Vander Sloten, J.; Ellingsen, J.E. The influence of static and dynamic loading on marginal bone reactions around osseointegrated implants: An animal experimental study. *Clin. Oral Implant. Res.* **2001**, *12*, 207–218. [[CrossRef](#)]
41. Rubin, C.; Gross, T.; Qin, Y.X.; Fritton, S.; Guilak, F.; McLeod, K. Differentiation of the bone-tissue remodeling response to axial and torsional loading in the turkey ulna. *J. Bone Joint Surg. Am.* **1996**, *78*, 1523–1533. [[CrossRef](#)]
42. Qin, Y.X.; McLeod, K.J.; Guilak, F.; Chiang, F.P.; Rubin, C.T. Correlation of bony ingrowth to the distribution of stress and strain parameters surrounding a porous-coated implant. *J. Orthop. Res.* **1996**, *14*, 862–870. [[CrossRef](#)]
43. Tsuge, T.; Hagiwara, Y. Influence of lateral-oblique cyclic loading on abutment screw loosening of internal and external hexagon implants. *Dent. Mater. J.* **2009**, *28*, 373–381. [[CrossRef](#)]
44. Kern, M.; Strub, J.R.; Lu, X.Y. Wear of composite resin veneering materials in a dual-axis chewing simulator. *J. Oral Rehabil.* **1999**, *26*, 372–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Murphy, T.R. The timing and mechanism of the human masticatory stroke. *Arch. Oral Biol.* **1965**, *10*, 981–994. [[CrossRef](#)]
46. Matsuzaki, T.; Ayukawa, Y.; Matsushita, Y.; Sakai, N. Effect of post-osseointegration loading magnitude on the dynamics of peri-implant bone: A finite element analysis and in vivo study. *J. Prosthodont. Res.* **2019**, *63*, 453–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kuroshima, S.; Nakano, T.; Ishimoto, T.; Sasaki, M.; Inoue, M.; Yasutake, M.; Sawase, T. Optimally oriented grooves on dental implants improve bone quality around implants under repetitive mechanical loading. *Acta Biomater.* **2017**, *15*, 433–444. [[CrossRef](#)]
48. Sasaki, M.; Kuroshima, S.; Aoki, Y.; Inaba, N.; Sawase, T. Ultrastructural alterations of osteocyte morphology via loaded implants in rabbit tibiae. *J. Biomech.* **2015**, *48*, 4130–4141. [[CrossRef](#)]
49. Marx, R.E.; Shellenberger, T.; Wimsatt, J.; Correa, P. Severely resorbed mandible: Predictable reconstruction with soft tissue matrix expansion (tent pole) grafts. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2002**, *60*, 878–879. [[CrossRef](#)]
50. Liu, J.; Huang, Q.; Wang, X.; Li, Y.; Zhou, J.; Zeng, D.; Jiang, X.; Zhao, K.; Zhou, Y. Early loading of splinted implants in posterior mandible: Three-year results of a prospective multicenter study. *Clin. Oral Implant. Res.* **2019**, *30*, 1049–1058. [[CrossRef](#)]
51. Akoglan, M.; Tatli, U.; Kurtoglu, C.; Salimov, F.; Kurkcu, M. Effects of different loading protocols on the secondary stability and peri-implant bone density of the single implants in the posterior maxilla. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2017**, *19*, 624–631. [[CrossRef](#)]
52. 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**, *34*, 45–51.
53. Degidi, M.; Daprile, G.; Piattelli, A.; Carinci, F. Evaluation of factors influencing resonance frequency analysis values, at insertion surgery, of implants placed in sinus-augmented and nongrafted sites. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2007**, *9*, 144–149. [[CrossRef](#)]
54. Piattelli, A.; Corigliano, M.; Scarano, A.; Costigliola, G.; Paolantonio, M. Immediate loading of titanium plasma-sprayed implants: An histologic analysis in monkeys. *J. Periodontol.* **1998**, *69*, 321–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Nkenke, E.; Lehner, B.; Weinzierl, K.; Thams, U.; Neugebauer, J.; Steveling, H.; Radespiel-Tröger, M.; Neukam, F.W. Bone contact, growth, and density around immediately loaded implants in the mandible of mini pigs. *Clin. Oral Implant. Res.* **2003**, *14*, 312–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Linares, A.; Mardas, N.; Dard, M.; Donos, N. Effect of immediate or delayed loading following immediate placement of implants with a modified surface. *Clin. Oral Implant. Res.* **2011**, *22*, 38–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Manresa, C.; Echeverri, J.; Manresa, C. The comparison between implant stability quotient and bone-implant contact revisited: An experiment in Beagle dog. *Clin. Oral Implant. Res.* **2014**, *25*, 1213–1221. [[CrossRef](#)]
58. Park, I.P.; Kim, S.K.; Lee, S.J.; Lee, J.H. The relationship between initial implant stability quotient values and bone-to-implant contact ratio in the rabbit tibia. *J. Adv. Prosthodont.* **2011**, *3*, 76–80. [[CrossRef](#)]
59. Ito, Y.; Sato, D.; Yoneda, S.; Ito, D.; Kondo, H.; Kasugai, S. Relevance of resonance frequency analysis to evaluate dental implant stability: Simulation and histomorphometrical animal experiments. *Clin. Oral Implant. Res.* **2008**, *19*, 9–14. [[CrossRef](#)]
60. Schliephake, H.; Sewing, A.; Aref, A. Resonance frequency measurements of implant stability in the dog mandible: Experimental comparison with histomorphometric data. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2006**, *35*, 941–946. [[CrossRef](#)]
61. Brizuela-Velasco, A.; Álvarez-Arenal, Á.; Gil-Mur, F.J.; Herrero-Climent, M.; Chávarri-Prado, D.; Chento-Valiente, Y.; Dieguez-Pereira, M. 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**, *24*, 607–611. [[CrossRef](#)]
62. Sennerby, L.; Meredith, N. Implant stability measurements using resonance frequency analysis: Biological and biomechanical aspects and clinical implications. *Periodontol. 2000* **2008**, *47*, 51–66. [[CrossRef](#)]
63. Trindade, R.; Albrektsson, T.; Galli, S.; Prgomet, Z.; Tengvall, P.; Wennerberg, A. Osseointegration and foreign body reaction: Titanium implants activate the immune system and suppress bone resorption during the first 4 weeks after implantation. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2018**, *20*, 82–91. [[CrossRef](#)]
64. Tian, Y.; Li, Z.; Chen, J.; Yuan, X.; Sadowsky, S.J.; Coyac, B.R.; Brunski, J.B.; Helms, J.A. Mechano-adaptive responses of alveolar bone to implant hyper-loading in a pre-clinical in vivo model. *Clin. Oral Implant. Res.* **2020**, *31*, 1159–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

GUIA ARRIVE



National Centre for the Replacement, Refinement
and Reduction of Animals in Research

The ARRIVE guidelines Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments

Carol Kilkenny¹, William J Browne², Innes C Cuthill³, Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman⁵

¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK

	ITEM	RECOMMENDATION
TITLE	1	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.
ABSTRACT	2	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.
INTRODUCTION		
Background	3	<p>a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale.</p> <p>b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.</p>
Objectives	4	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.
METHODS		
Ethical statement	5	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.
Study design	6	<p>For each experiment, give brief details of the study design including:</p> <p>a. The number of experimental and control groups.</p> <p>b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when).</p> <p>c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals).</p> <p>A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.</p>
Experimental procedures	7	<p>For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example:</p> <p>a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s).</p> <p>b. When (e.g. time of day).</p> <p>c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze).</p> <p>d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).</p>
Experimental animals	8	<p>a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range).</p> <p>b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naive, previous procedures, etc.</p>

The ARRIVE guidelines: Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments. Originally published in PLoS Biology, June 2010¹

	ITEM	RECOMMENDATION
Housing and husbandry	9	Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.
Sample size	10	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.
Allocating animals to experimental groups	11	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).
Statistical methods	13	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.
RESULTS		
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naive) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).
Numbers analysed	15	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50%). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why.
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).
Adverse events	17	a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.
DISCUSSION		
Interpretation/scientific implications	18	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results ² . c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.
Generalisability/translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.

The ARRIVE guidelines: Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments. Originally published in PLoS Biology, June 2010¹

The guidelines are intended to:

- Improve reporting of research using animals.
- Guide authors as to the essential information to include in a manuscript, and not be absolutely prescriptive.
- Be flexible to accommodate reporting a wide range of research areas and experimental protocols.
- Promote reproducible, transparent, accurate, comprehensive, concise, logically ordered, well written manuscripts.
- Improve the communication of the research findings to the broader scientific community.

The guidelines are NOT intended to:

- Promote uniformity, stifle creativity, or encourage authors to adhere rigidly to all items in the checklist. Some of the items may not apply to all studies, and some items can be presented as tables/figure legends or flow diagrams (e.g. the numbers of animals treated, assessed and analysed).
- Be a guide for study design and conduct. However, some items on the checklist, such as randomisation, blinding and using comparator groups, may be useful when planning experiments as their use will reduce the risk of bias and increase the robustness of the research.

What kind of research areas do the guidelines apply to?

- The guidelines will be most appropriate for comparative studies, where two or more groups of experimental animals are being compared; often one or more of the groups may be considered as a control. They apply also to studies comparing different drug doses, or, for example, where a single animal is used as its own control (within-subject experiment).
- Most of the recommendations also apply to studies that do not have a control group.
- The guidelines are suitable for any area of bioscience research where laboratory animals are used.

Who are the guidelines aimed at?

- Novice and experienced authors
- Journal editors
- Peer reviewers
- Funding bodies

How might these guidelines be used?

The guidelines provide a checklist for those preparing or reviewing a manuscript intended for publication.

References

1. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
2. Schulz KF, Altman DG, Moher D, the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 340:c332.

Acknowledgements

The NC3Rs gratefully acknowledges the expertise and advice that all the contributors have given to developing the guidelines. We would particularly like to acknowledge the contribution of the NC3Rs Reporting Guidelines Working Group† – Professor Doug Altman, Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford UK, Professor David Balding, Department of Epidemiology & Public Health, Imperial College, London UK, Professor William Browne, Department of Clinical Veterinary Science, University of Bristol UK, Professor Innes Cuthill, School of Biological Sciences, University of Bristol UK, Dr Colin Dunn, Editor Laboratory Animals (Royal Society of Medicine press), Dr Michael Emerson, National Heart and Lung Institute, Imperial College, London UK, Dr Stella Hurlley, Senior Editor Science, Professor Ian McGrath, Editor-in-Chief British Journal of Pharmacology (Wiley Blackwell Publishers) and Dr Clare Stanford, Department of Psychopharmacology, University College, London UK. We would also like to thank NC3Rs grant holders, the Medical Research Council, Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC), Wellcome Trust, Parkinson's Disease Society, British Heart Foundation and their grant holders and funding committee members who provided feedback on the guidelines; and Kathryn Chapman and Vicky Robinson (both NC3Rs) for their help with the manuscript.

†Please note: that the working group members who contributed to these guidelines were advising in their personal capacity and their input does not necessarily represent the policy of the organisations with which they are associated.

Funding

The reporting guidelines project was funded by the National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs).

