

**UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA**



**INFLUENCIA DE CONCENTRADOS  
AUTÓLOGOS DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES (UFC-GM) EN  
LA FIJACIÓN DE IMPLANTES  
DENTALES AL HUESO**

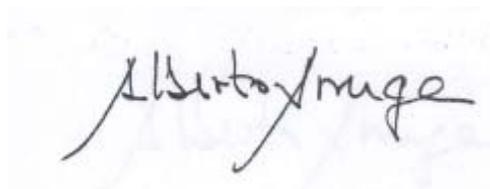
**Tesis Doctoral**

**ALBERTO ARRUGA ARTAL**

Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Alberto Arruga Artal  
D.L.: GR 493-2012  
ISBN: 978-84-694-5738-2

**Alberto Arruga Artal** es autor y presenta el trabajo de tesis doctoral titulado *“Influencia de concentrados autólogos de células mononucleares (UFC-GM) en la fijación de implantes dentales al hueso”* bajo la dirección del profesor Alberto Rodríguez Archilla para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

A handwritten signature in black ink, reading "Alberto Arruga". The signature is written in a cursive style with a large initial 'A' and a long horizontal stroke at the end.

Fdo.: Alberto Arruga Artal



Universidad de Granada



Facultad de Odontología

**Alberto Rodríguez Archilla**, Profesor Titular de Medicina Bucal de la Universidad de Granada, Director de la Tesis Doctoral titulada: *“Influencia de concentrados autólogos de células mononucleares (UFC-GM) en la fijación de implantes dentales al hueso”* de la que es autor D. **Alberto Arruga Artal**, realizada dentro del Programa de Doctorado *“Investigación en Estomatología”* desarrollado por el Departamento de Estomatología de la Universidad de Granada.

**AUTORIZA** la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 56/2005, de 21 de enero, emitiendo el siguiente informe:

Los trabajos efectuados en la elaboración de esta memoria han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas y científicas necesarias para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente en Granada a veinte y uno de marzo de dos mil once.

Fdo.: Alberto Rodríguez Archilla

A mis **hijos**

A mis **padres** y **hermanos**

# AGRADECIMIENTOS

A las siguientes personas, sin las cuales no habría sido capaz de llevar a cabo esta tesis doctoral:

- Al profesor **Alberto Rodríguez Archilla** por la dirección de esta tesis, saber tener paciencia conmigo y darme la oportunidad de aprender de él tantísimas cosas.
- Al profesor **José Antonio Bea Cascarosa**; gran investigador y querido amigo, por centrarme en cada momento en lo prioritario.
- Al profesor **Francisco Gómez Casal**; por su generosidad y ayuda al introducirme en el apasionante campo de las células madre.
- Al profesor **José Antonio Moreno Chulilla**; por su paciencia y ayuda en lo concerniente a la hematología.
- Al profesor **Tomas Castiella Muruzabal**; por su amabilidad y ayuda en el campo de la histología ósea.
- Al profesor **Emilio Del Cacho Malo**; por su amabilidad y ayuda en la citometría de flujo y en la inmunohistoquímica.
- A la doctora **María Carmen Lidón Lorente**; excelente profesional y mejor persona, por su amistad y extraordinarios consejos
- Al doctor **Zhongzhao Teng**; por los inolvidables recuerdos durante la investigación animal.
- Al profesor **Manuel Doblare Castellano**; por creer en mí y darme la oportunidad de investigar en el seno de su cátedra hace ya 25 años
- A las enfermeras **Mamen Navarro** y **Clara Tapia** de la U.M.I. de biotecnología y biomedicina de Zaragoza; por su paciencia, colaboración y ayuda.
- A la señora **Elena Clavero Arévalo**; por su gran amabilidad y ayuda desde el primer momento en que nos conocimos hasta ahora.
- A mis queridos hermanos **Francisco** y **Carlos Arruga Artal**; por su colaboración y compañía en este gran viaje que es la vida.
- A **todas aquellas personas** que, a veces sin saberlo, también han aportado su opinión sincera y su estímulo.

MUCHAS GRACIAS

# ÍNDICE

Abreviaturas .....	10
<hr/>	
INTRODUCCIÓN	13
<hr/>	
1. Estructura y función del hueso normal	13
2. Histología del tejido óseo	14
2.1. Matriz ósea	14
2.2. Células óseas	15
2.3. Dinámica del hueso	22
2.4. Interacción implante dental-hueso: biocompatibilidad	28
2.5. Fundamentos biológicos de la cicatrización de los implantes	33
2.6. Movilidad diente/implante	37
2.7. Carga Inmediata y tratamientos superficiales	38
2.8. Osteointegración y comportamiento mecánico de la interfaz	42
2.9. Tratamientos superficiales y biológicos	44
2.10. Evolución histórica	51
2.11. Aplicaciones médicas del plasma rico en factores de crecimiento	51
2.12. Aplicaciones del plasma rico en factores de crecimiento en odontología y cirugía maxilofacial	56
<hr/>	
OBJETIVOS	59
<hr/>	
MATERIAL Y MÉTODOS	61
<hr/>	
1. Descripción de la muestra	61
2. Extracción de sangre y obtención del concentrado leucoplaquetar (CLP) y de la fracción de células mononucleares (CMN)	62
3. Incubación y cultivo de los implantes con CLP o CMN	64
4. Colocación de los implantes	65
5. Sacrificio y necropsia	68
6. Medición de la fuerza de desinserción (torque) de los implantes.	68
7. Evaluación del grado de maduración ósea	68
8. Evaluación del desplazamiento del implante dentro del lecho óseo tras el sometimiento a carga.	69
9. Método estadístico	71
<hr/>	
RESULTADOS	73
<hr/>	
DISCUSIÓN	86
<hr/>	
CONCLUSIONES	101
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA ORDENADA	103
<hr/>	
ANEXOS	134
<hr/>	
PATENTES	137
<hr/>	

# ABREVIATURAS

- ADP:** Adenosindifosfato
- AFA:** Fibrina Autóloga Adhesiva
- ARF:** Activación-Reabsorción-Formación de hueso
- BMPs:** Proteínas Morfogenéticas del Hueso
- BMU:** Unidad Multicelular Básica
- Bone Turnover:** Recambio óseo
- BSU:** Unidad Estructural Osea
- Célula de Carga:** Transductor que convierte la fuerza mecánica en señales eléctricas.
- C-fos:** Oncogen que desarrolla osteopetrosis
- CFU:** Unidad Formadora de Colonias
- CFU-F:** Unidad Formadora de Colonias de Fibroblastos
- CFU-GM:** Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
- C-src:** Oncogen que desarrolla osteopetrosis
- EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico
- FGF:** Factor de Crecimiento Fibroblástico
- GAPs:** Lagunas de Unión
- GFs:** Factores de Crecimiento
- HSC:** Célula Madre Hematopoyética
- IGF:** Factor de Crecimiento similar a la Insulina
- IGF-1:** Factor de Crecimiento relacionado con Insulina tipo 1
- IL- 11:** Interleukina 11
- IL-1:** Interleukina 1
- IL-6:** Interleukina 6
- Lining Cells:** Células de linaje osteoblástico
- MO:** Médula ósea
- MSCs:** Células Madre Mesenquimales
- PDGF:** Factores de Crecimiento derivados de Plaquetas
- PKC:** Proteína quinasa C
- PPP:** Plasma Pobre en Plaquetas
- PRGF:** Plasma Rico en Factores de Crecimiento
- PRF:** Plasma rico en Fibrina
- PRP:** Plasma Rico en Plaquetas
- PTH:** Hormona paratiroidea

**SP:** Sangre Periférica

**TGF-  $\beta$ 1:** Factor de Crecimiento Transformador  $\beta$ 1

**TGF-  $\beta$ 2:** Factor de Crecimiento Transformador  $\beta$ 2

**TGF- $\beta$ :** Factor de Crecimiento Tumoral  $\beta$

**TRAP:** Fosfatasa ácida resistente al tartrato

**VEGF:** Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

# INTRODUCCIÓN

## 1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL HUESO NORMAL

Los huesos responden a las fuerzas aplicadas sobre su superficie siguiendo un patrón característico. La primera fase es elástica y depende de la rigidez del hueso. En esta fase, la deformación es temporal y se mantiene solo durante el tiempo de aplicación de la fuerza tras lo cual, el hueso recupera su forma original. Si la fuerza aumenta, se entra en una fase plástica y el hueso, aunque se recupera parcialmente, queda deformado. Por último cuando la fuerza aplicada es superior a la resistencia del tejido se produce la fractura (Byers y Woods, 1994; Teitelbaum, 1993).

La respuesta de tejido óseo frente a las fuerzas que se aplican sobre su superficie dependerá del tipo de fuerza, del tipo de hueso, así como de la densidad, arquitectura y composición del tejido óseo. Las fuerzas que pueden actuar sobre el tejido óseo son de tres tipos tensión, compresión y torsión. Además pueden ser aplicadas de forma perpendicular a la superficie ósea (fuerza normal) o de forma oblicua (fuerza de cizallamiento).

Los huesos largos, formados fundamentalmente por tejido óseo compacto o cortical, son elásticos y poco plásticos. En estos huesos, la resistencia será mayor cuando la fuerza se aplica de forma vertical al sentido de la carga. Cuando la fuerza se aplica de forma oblicua la fase plástica se acorta y el hueso se fractura con más rapidez. En los huesos integrados por tejido óseo esponjoso, la resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica a lo largo del eje vertical de las trabéculas vertebrales y también cuando es paralela a los sistemas trabeculares del cuello femoral. Estos huesos, al ser menos densos que los formados por tejido óseo cortical, son menos elásticos y más plásticos, por lo que pueden presentar deformaciones mayores. Así mientras que en los huesos integrados por tejido esponjoso, las fracturas se producen cuando existen variaciones del 7% de su longitud, en los integrados por tejido compacto, las fracturas se producen con variaciones del 2% (Byers y Woods, 1994; Teitelbaum, 1993).

## 2. HISTOLOGÍA DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado compuesto por una matriz ósea y células. Estas células del tejido óseo son: los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos.

### 2.1. Matriz ósea

Más de un 99% en volumen de la matriz ósea se halla mineralizado (hueso cortical: 99,9%; hueso esponjoso: 99,2%) por lo que posee un componente orgánico y otro inorgánico. El componente orgánico se halla integrado por *colágeno tipo I* (85-90%) y una pequeña proporción de otras proteínas (10-15%): proteoglicanos (biglicano, decorina), proteínas implicadas en la adhesión celular (trombospondina, osteonectina, sialoproteína ósea), osteocalcina y factores de crecimiento (Termine, 1993). En el hueso maduro las fibras colágenas se disponen en láminas paralelas (hueso laminar) pero en cada lámina las fibras forman un ángulo agudo con respecto a las de las láminas contiguas. Esta disposición determina que al observar hueso laminar mediante luz polarizada alternen las láminas claras de aspecto muy brillante -láminas birrefringentes: fibras orientadas perpendicularmente a luz polarizada- con las oscuras -láminas no birrefringentes: fibras orientadas en un ángulo más o menos agudo con respecto a la luz polarizada- (Gurley, 1992; González-Macías y Serrano, 1995; Vigorita, 2008).

No obstante, estudios recientes mediante microscopía electrónica de barrido ponen en duda esta concepción clásica. Estos estudios sugieren que la alternancia de láminas claras y oscuras podría ser debido a que en las láminas birrefringentes existe una mayor densidad de fibras y no a una distinta orientación de éstas (Crofts y Bloebaum, 1994).

En el hueso embrionario o inmaduro las fibras se disponen de manera desordenada: hueso plexiforme. Cuando este tipo de hueso se observa mediante luz polarizada no muestra alternancia de bandas claras y oscuras sino un aspecto finamente fibrilar (Gurley, 1992; González-Macías y Serrano, 1995; Vigorita, 2008). Este aspecto es debido a que solo brillan las escasas fibras colágenas que al azar han quedado dispuestas perpendicularmente a la luz polarizada. En el esqueleto adulto normal el hueso plexiforme prácticamente ha desaparecido, pero puede

formarse de nuevo si se acelera la producción de matriz (callos de fractura, tumores óseos...).

El componente inorgánico de la matriz ósea está constituido en su mayor parte por fosfato cálcico en forma de cristales de *hidroxiapatita*. El hueso laminar se halla más densamente mineralizado que el hueso plexiforme. La matriz ósea que no se halla mineralizada constituye menos del 1% en volumen del total y se denomina *osteoides* (González-Macías y Serrano, 1995; Gurley, 1992; Vigorita, 2008).

El osteoide puede observarse en forma de finos ribetes de unas 10 micras de espesor que revisten la superficie de algunas trabéculas y tapizan algunas cavidades intracorticales.

La matriz ósea es la responsable de las extraordinarias propiedades biomecánicas del hueso. Las fibras colágenas le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión. De hecho esta estructura es muy similar a la que se trató de conseguir cuando se desarrolló el hormigón armado. En este material de construcción el entramado de hierro realiza un papel funcional similar al que en el hueso llevan a cabo las fibras colágenas y el hormigón realiza el papel funcional que en el hueso lleva a cabo el mineral.

## 2.2. Células óseas

### 2.2.1. Linaje osteoblástico

Forman parte de este linaje los preosteoblastos, los osteoblastos y los osteocitos. Los **preosteoblastos** son células de aspecto fibroblástico cercanas a las superficies óseas pero separadas de estas por otros tipos celulares: células del endostio, osteoblastos, etc. (Puzas, 1993). Los preosteoblastos son difíciles de identificar en condiciones normales, pero pueden observarse con facilidad si sufren una hiperplasia como por ejemplo en el hiperparatiroidismo. Los preosteoblastos derivan de una célula madre del estroma medular (**CFU-F**: Unidad Formadora de Colonias de Fibroblastos) y en condiciones normales constituyen el compartimiento proliferativo del linaje osteoblástico. Los **osteoblastos** son células de forma cúbica,

citoplasma basófilo y ricas en una isoenzima específica de la fosfatasa alcalina (Puzas, 1993).

Derivan de los preosteoblastos y suelen considerarse células con diferenciación Terminal y por tanto incapaz de dividirse, no obstante existen datos que sugieren que, al menos en parte, conservan la capacidad de proliferar. Los osteoblastos se hallan en contacto directo con las superficies óseas formando grupos compactos de una sola capa de espesor. De manera característica el núcleo de estas células se sitúa en el extremo que se halla más alejado de la superficie ósea sobre la que asientan. El estudio ultraestructural permite comprobar que entre el núcleo y la superficie de contacto con el hueso se sitúan de manera sucesiva el aparato de Golgi y abundantes cisternas de retículo endoplásmico rugoso (Puzas, 1993).

Estas características ultraestructurales son típicas de las células con capacidad para segregar grandes cantidades de proteínas. Los osteoblastos sintetizan el componente orgánico de la matriz ósea (colágeno tipo I, proteoglicanos, proteínas implicadas en la adhesión celular, osteocalcina y factores de crecimiento) y controlan el depósito de las sales minerales. Tanto in vivo como in vitro los osteoblastos pasan sucesivamente por tres estadios funcionales (Owen et al., 1963; Lian y Stein, 1992; Stein y Lian, 1993):

- a) proliferación celular y síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea,
- b) maduración de la matriz ósea (cambios en la composición y organización de la matriz que la hacen competente para ser mineralizada) y
- c) depósito de mineral. In vitro se ha comprobado que estos estadios coinciden con la activación sucesiva de una serie de genes: c-fos, c-jun, histona H4, colágeno tipo I, fibronectina y factor transformante  $\beta$  (proliferación y síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea); fosfatasa alcalina (maduración de la matriz); sialoproteína ósea, osteopontina y osteocalcina (depósito de mineral).

Los osteoblastos pueden permanecer en las superficies óseas o quedar rodeados por la matriz que sintetizan. Cuando los osteoblastos que han

permanecido en la superficie finalizan la síntesis de matriz, se aplanan y se convierten en células de revestimiento (células del endostio o "*lining cells*"). Estas células a través de la producción de factores locales como la interleukina-6 o la interleukina-11 (Manolagas y Jilka, 1995; Elias et al., 1995) parecen desarrollar un importante papel en el control del remodelado óseo. Los osteoblastos que quedan en el espesor de la matriz adquieren aspecto estrellado y pasan a denominarse **osteocitos** (Puzas, 1993).

Estas células se hallan en contacto entre sí y con las de la células de la superficie (células de revestimiento, osteoblastos) mediante finas prolongaciones tubulares de su citoplasma que recorren la matriz ósea en diversas direcciones. La cavidad de la matriz ósea que contiene el cuerpo celular del osteocito se denomina laguna osteocitaria y los diminutos canalículos que albergan sus prolongaciones citoplásmicas reciben el nombre de conductos calcóforos. El estudio ultraestructural de los osteocitos revela que presentan un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso menos desarrollado que los osteoblastos. Estas organelas se concentran en el cuerpo celular donde se disponen alrededor del núcleo.

En los puntos de contacto entre las prolongaciones citoplásmicas se observan uniones tipo "**gap**" -*gap junctions*- (Alberts et al., 1994). En estas uniones existen pequeños canales intercelulares con un diámetro interno de 1.5 nm. Estos canales permiten el paso directo de una a otra célula de iones inorgánicos y pequeñas moléculas hidrosolubles (aminoácidos, azúcares, nucleótidos y vitaminas) por lo que posibilitan una comunicación química y eléctrica. Los osteocitos son células con una escasa actividad metabólica pero su preservación parece necesaria para que el tejido óseo mantenga sus propiedades biomecánicas. La situación de los osteocitos es teóricamente ideal para detectar el estrés mecánico y las microlesiones de la matriz. Estas células podrían transmitir señales a las células de revestimiento que utilizarían la información recibida para modular localmente el remodelado (Aubin et al., 1993).

Durante años se ha discutido acerca de si los osteocitos son o no capaces de inducir la osteolisis de la matriz que los rodea al ser estimulados por la PTH (osteolisis osteocitaria). En la actualidad esta posibilidad se considera del todo

improbable. El factor sistémico que de manera más potente induce in vivo la diferenciación y proliferación de las células del linaje osteoblástico es la hormona paratiroidea (PTH). Los osteoblastos poseen receptores para la PTH, pero algunos de los efectos de la hormona sobre estas células son probablemente mediados por factores locales. La PTH actuaría sobre las células del linaje osteoblástico estimulando la producción de factor de crecimiento relacionado con la insulina tipo I **IGF-I** (Watson et al., 1995; Pfeilschifter et al, 1995). Este factor local a su vez estimularía la proliferación de los osteoblastos y sus precursores por un mecanismo autocrino.

Además de la PTH otros factores sistémicos como la 1-25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub> y numerosos factores locales (interleukina-1, factor de necrosis tumoral y factor transformante  $\beta$  entre otros) afectan in vitro la función de los osteoblastos pero su importancia relativa in vivo se desconoce (Puzas, 1993).

### 2.2.2. Linaje Osteoclástico

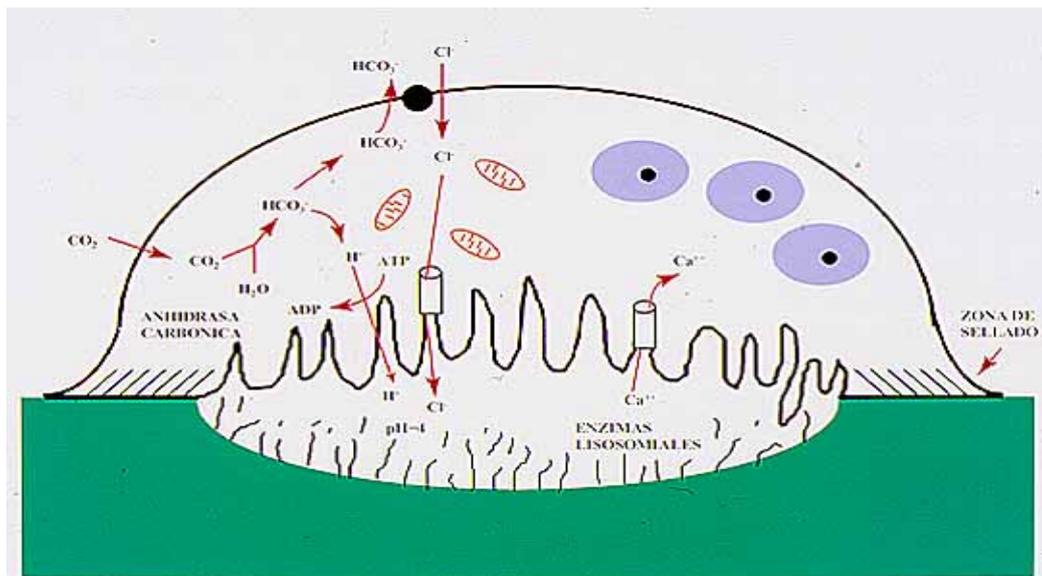
Los **osteoclastos** son células multinucleadas, de citoplasma acidófilo y ricas en anhidrasa carbónica y fosfatasa ácida resistente (González-Macías y Serrano, 1995; Gurley, 1992; Mundy, 1993). Son de mayor tamaño que los osteoblastos y se disponen sobre las superficies óseas de manera aislada o en grupos poco numerosos. Al igual que los osteoblastos son células polarizadas en la que los núcleos se sitúan en el extremo que se halla más alejado de la superficie ósea sobre la que asientan. Derivan de la célula madre hematopoyética a través de células formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (**CFU-GM**).

La proliferación de estas células es activada por el factor estimulante de colonias de macrófagos (**M-CSF**). El reclutamiento de los pre-osteoclastos a partir de las CFU-MG parece ser promovido por la IL-1, IL6 e IL-11. Los **pre-osteoclastos** son células dotadas de un solo núcleo que se adhieren a las superficies óseas y al fusionarse entre sí dan lugar a los osteoclastos (Parfitt, 1994). Los pre-osteoclastos expresan en su membrana moléculas de adhesión pertenecientes a la familia de las **cadherinas** que parecen intervenir en la fusión de estas células.

Los pre-osteoclastos de la médula ósea pueden dar lugar por fusión a los osteoclastos que remodelan el hueso esponjoso o pasar a la circulación. Para que estas células mononucleares circulantes puedan regresar por diapédesis al microambiente óseo deben adherirse a las células endoteliales. Se piensa que esta adhesión es posible porque los osteoclastos y sus precursores expresan en su membrana una proteína denominada **anexina II** (Parfitt, 1994).

Dado que en el hueso cortical no existe médula ósea es probable que los osteoclastos que intervienen en su remodelación procedan de precursores circulantes que hayan emigrado del interior de los capilares sanguíneos de los conductos de Havers. La adhesión de los precursores de los osteoclastos a la matriz ósea tiene lugar en aquellos puntos donde ésta queda expuesta porque se separan entre sí las células de revestimiento al modificarse la conformación de su citoesqueleto. Las células de revestimiento son de origen osteoblástico y poseen receptores para la PTH por lo que se ha sugerido que esta hormona podría desencadenar el proceso. La adhesión de las células de estirpe osteoclástica a la matriz es posible porque expresan en su membrana moléculas de adhesión de la familia de las **integrinas**.

La integrina  $\alpha_2\beta_1$  interacciona con el colágeno y la integrina  $\alpha_v\beta_3$  con la vitronectina, osteopontina y sialoproteína ósea (Parfitt, 1994). El estudio ultraestructural de los osteoclastos revela que sus organelas se concentran en el citoplasma perinuclear donde los complejos de Golgi son abundantes (Gurley, 1992). En el resto del citoplasma se observan abundantes mitocondrias y estructuras vesiculares de diversas densidades y tamaños. Es probable que algunas de estas estructuras vesiculares correspondan a lisosomas ricos en TRAP y colagenasas. Las cisternas del retículo endoplásmico rugoso no son muy numerosas ni muy extensas. Es característico de estas células que la zona de su membrana que entra en relación con la matriz ósea se halle fruncida. Entre los plegamientos de la membrana y la matriz ósea existe un estrecho espacio poco denso a los electrones. A ambos lados de la zona de plegamiento la membrana se aplanan y se adhieren más íntimamente a la matriz. En las tres dimensiones del espacio este segmento aplanado corresponde a un rodete que adhiere el osteoclasto a la superficie ósea de manera parecida a como lo haría el borde de una ventosa (figura 1).



**Figura 1.-** Esquema de los mecanismos implicados en la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos.

Tomado de: Serrano S. Estructura y función del hueso normal. II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica, 1998. [Acceso 6 de octubre de 2008]. Disponible en: <http://www.conganat.org/iicongreso/conf/018/osteocl.htm>

Así, el espacio comprendido entre la membrana fruncida y la matriz ósea queda convertido en un microambiente que se halla aislado del intersticio medular. El segmento de citoplasma adyacente a esta zona aplanada se halla libre de organelas por lo que se denomina **zona clara** (Gurley, 1992; Mundy, 1993). Esta zona contiene abundantes microfilamentos de **actina** que probablemente se relacionan con la capacidad de traslación de la célula. De hecho los osteoclastos a medida que reabsorben el hueso realizan un movimiento de vaivén parecido al que efectúa el cepillo de un carpintero.

El territorio sobre el que se desplaza un osteoclasto durante el proceso de reabsorción es varias veces superior al de la superficie de la célula y se denomina **dominio osteoclástico**. La TRAP es capaz de desfosforilar la osteopontina y la sialoproteína ósea por lo que podría facilitar los movimientos de la célula al separarla de estas proteínas de la matriz. Los osteoclastos reabsorben el hueso en dos fases. Primero solubilizan el mineral y luego digieren la matriz orgánica (Gurley, 1992; Mundy, 1993). El mineral se solubiliza acidificando el microambiente creado entre la matriz ósea y la membrana fruncida del osteoclasto. La acidificación ( $\text{pH}=4$ ) se logra bombeando hacia el hueso los iones  $\text{H}^+$ . En el citoplasma de los osteoclastos la

anhidrasa carbónica cataliza la reacción entre el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}$  dando lugar a  $\text{CO}_3\text{H}_2$  que se disocia en  $\text{CO}_3\text{H}^-$  y  $\text{H}^+$ .

El  $\text{H}^+$  es bombeado activamente hacia la matriz ósea a través de la membrana plegada mediante una bomba de protones dotada de una ATPasa específica (Mundy, 1993).

El  $\text{CO}_3\text{H}^-$  es expulsado fuera de la célula a través de la superficie opuesta donde es intercambiado activamente por  $\text{Cl}^-$  (Mundy, 1993). El  $\text{Cl}^-$  no se acumula en el interior del osteoclasto puesto que es vehiculado hacia la matriz ósea a través de canales específicos situados en la membrana plegada. Una vez eliminado el mineral la matriz orgánica es digerida por colagenasas ácidas y otras enzimas proteolíticas de origen lisosómico. Cuando se ha completado el proceso de reabsorción los osteoclastos mueren por apoptosis (Miyazaka et al., 1996).

Los núcleos se hacen más pequeños e hipercromáticos y se fragmentan hasta desaparecer y el citoplasma aumenta su acidofilia y se retrae. Estos restos celulares serán fagocitados por células macrofágicas. In Vitro la apoptosis de los osteoclastos es promovida por factor de crecimiento tumoral beta (**TGF- $\beta$** ). Se ha observado que ratones con alteraciones en los oncogenes **c-src** y **c-fos** desarrollan osteopetrosis por lo que estos genes parecen implicados en los mecanismos de control de la reabsorción (Wang et al., 1992).

La calcitonina es capaz de inhibir funcionalmente a los osteoclastos a través de receptores específicos pero el papel de esta hormona en condiciones normales parece poco importante. Los osteoclastos carecen de receptores para la PTH. La actividad reabsortiva de los osteoclastos y la osteoclastogénesis parecen ser activadas por la IL-6 e IL-11 producidas por células de estirpe osteoblástica (Manolagas y Jilka, 1995; Elias et al., 1995).

La producción de IL-6 e IL-11 sería a su vez estimulada por hormonas (PTH, 1-25 dihidroxivitamina  $\text{D}_3$ ) y por factores locales (IL-1, factor de necrosis tumoral). Este modelo ofrece amplias posibilidades tanto para la regulación sistémica de la actividad reabsortiva como para la regulación local del acoplamiento entre

reabsorción y formación óseas. Además de los descritos, existen otros mecanismos de regulación local de la actividad funcional de los osteoclastos. Así, el calcio liberado durante la reabsorción puede penetrar en el interior del osteoclasto a través de canales de  $\text{Ca}^{++}$  situados en la membrana plegada e inhibir la actividad reabsortiva de estas células (Alberts et al., 1994).

Los factores de crecimiento de origen osteoblástico enterrados en la matriz y liberados durante la reabsorción parecen ser también importantes para el mantenimiento de la actividad funcional de los osteoclastos.

### 2.3. Dinámica del hueso

El esqueleto, a pesar de estar constituido en su mayor parte por matriz extracelular, es uno de los sistemas más dinámicos del organismo y presenta fenómenos de crecimiento, modelado, remodelado y reparación.

#### 2.3.1. Crecimiento óseo

El crecimiento óseo se inicia en la vida embrionaria y sigue hasta la pubertad. El crecimiento en longitud se efectúa mediante la adición de hueso nuevo a la cara diafisaria de la **placa de crecimiento o fisis** (Gurley, 1992). La placa de crecimiento es una estructura con forma de disco que se halla intercalada entre la epífisis y la diáfisis. En la placa de crecimiento se distinguen dos regiones, una central y otra periférica. La región central está constituida por cartílago hialino en el que se distinguen, desde la epífisis a la diáfisis, cuatro zonas: zona germinal, zona proliferativa, zona de cartílago hipertrófico y zona de cartílago calcificado (Gurley, 1992).

**Zona germinal** (capa de reserva o de reposo): Es la zona más cercana a la epífisis. Está constituida por células cartilaginosas aisladas de forma oval. En esta capa se observan mitosis y existe una intensa síntesis de matriz extracelular

**Zona proliferativa:** Se halla constituida por células cartilaginosas en forma de cuña cuyo eje mayor es perpendicular al del hueso. Estas células se disponen

en columnas paralelas al eje longitudinal del hueso. En esta zona también se observan mitosis y existe una intensa síntesis de matriz extracelular. Las células de cada columna parecen dividirse al unísono pero de manera asincrónica con respecto a las de las columnas restantes.

**Zona de cartílago hipertrófico:** Los condrocitos de esta zona maduran, adquieren forma redondeada y su tamaño aumenta a medida que se alejan de la epífisis.

**Zona de cartílago calcificado:** En esta zona la matriz cartilaginosa se mineraliza. El núcleo de los condrocitos pierde cromatina (cariolisis) y su citoplasma se vacuoliza. Finalmente estas células mueren y desaparecen por lo que en el extremo de cada columna se observa un espacio vacío rodeado por matriz cartilaginosa calcificada que corresponde al que anteriormente ocupaba un condrocito. Sobre esta matriz calcificada los osteoblastos del estroma de la medula diafisaria depositarán hueso plexiforme (osificación de tipo endocondral). En el curso del modelado óseo este hueso inmaduro será sustituido por hueso laminar.

La región periférica de la placa de crecimiento se denomina **zona de Ranvier**. Esta zona es un anillo de sección triangular y base externa que rodea la región central de la fisis. La zona de Ranvier se halla constituida por células inmaduras con diferenciación condroblástica y osteoblástica. Las primeras podrían contribuir al crecimiento circunferencial de la placa de crecimiento y las segundas podrían contribuir al crecimiento en longitud de la cortical diafisaria.

El crecimiento en espesor del hueso se logra mediante la aposición concéntrica subperióstica de tejido óseo. Las células de la capa más interna del periostio se diferencian en osteoblastos que depositan hueso directamente sobre la superficie externa de la cortical diafisaria (osificación de tipo intramembranoso).

El crecimiento óseo depende de factores genéticos y se halla influido por factores sistémicos (hormonas) y locales. Las hormonas que intervienen en el control del crecimiento óseo se pueden dividir en cuatro grupos (Teitelbaum, 1992):

- Hormonas necesarias para el crecimiento: hormona de crecimiento, hormona tiroidea, insulina.
- Hormonas inhibidoras del crecimiento: cortisol
- Hormonas activadoras de la maduración: hormonas sexuales
- Vitamina D y Hormona paratiroidea

Los factores locales que pueden influir sobre el crecimiento son de tipo nervioso y de tipo mecánico. Se desconoce el mecanismo por el que el sistema nervioso interviene sobre el crecimiento óseo. Se ha sugerido que podría intervenir de manera indirecta a través del control del flujo sanguíneo. El resultado de la acción de las fuerzas mecánicas depende de su intensidad así como de su dirección y sentido. Las fuerzas de compresión paralelas a la dirección del crecimiento disminuyen la actividad de la fisis.

Las fuerzas de tracción paralelas a la dirección del crecimiento si son de pequeña intensidad pueden incrementar ligeramente el crecimiento pero si son de gran magnitud pueden causar epifisiolisis ó fusión prematura. Las fuerzas perpendiculares a la dirección del crecimiento producen un efecto deformante que es directamente proporcional a la fuerza aplicada e inversamente proporcional al diámetro del hueso.

### 2.3.2. Modelado óseo

En las metáfisis, el crecimiento óseo se asocia a fenómenos de reabsorción en la superficie externa y de formación en la interna, mientras que, en las diáfisis, ocurre lo contrario. Este proceso se denomina modelado óseo y permite que los distintos huesos conserven su forma durante el proceso de crecimiento. Asimismo el modelado óseo es el mecanismo que permite una renovación constante del esqueleto antes de que cese el crecimiento. Las alteraciones del modelado pueden causar deformidades óseas (Teitelbaum, 1992).

El modelado está programado genéticamente pero es probable que existan factores mecánicos de carácter local que pueden influir sobre el mismo. En este sentido existen datos experimentales que sugieren que la tensión que ejerce el manguito perióstico sobre ambos extremos óseos es un factor que contribuye a que

aparezcan osteoclastos sobre la superficie externa del cono metafisario (Hernández et al., 1995).

### 2.3.3. Remodelado óseo

En el adulto, cerca de un 8% del tejido óseo es renovado anualmente. Esta cifra es superior en el joven e inferior en el anciano (Serrano y Mariñoso, 1990). El remodelado óseo se lleva a cabo mediante la acción sucesiva (**acoplamiento**) de osteoclastos y osteoblastos sobre una misma superficie ósea. Cada **ciclo de remodelado** consta de tres fases: reabsorción, reposo o inversión y formación. En la fase de reabsorción, un grupo de osteoclastos se diferencia a partir de sus precursores y erosiona una superficie ósea dando lugar a imágenes en sacabocados conocidas como lagunas de Howship (Serrano y Mariñoso, 1990).

Una vez finalizada la reabsorción los osteoclastos son eliminados por apoptosis. La fase de reposo o inversión es un periodo de aparente inactividad. Durante la fase de formación un grupo de osteoblastos se diferencia a partir de sus precursores y rellena con hueso nuevo la zona excavada por los osteoclastos. Los osteoblastos depositan en primer lugar matriz ósea no mineralizada que forma una capa de unas 10 micras de espesor denominada **ribete de osteoide**. Entre el depósito de osteoide y su mineralización existe un **tiempo de demora** (*Mineral Lag Time*) de unos 10 a 20 días (Serrano y Mariñoso, 1990).

Durante este periodo la matriz ósea sufre cambios en su composición y estructura que la hacen apta para el depósito de mineral (maduración de la matriz). La mineralización se inicia en la interfase entre el osteoide y el hueso mineralizado preexistente y avanza hacia la superficie a lo largo de un plano de barrido de 2 a 3 micras de espesor. Este plano, integrado en parte por mineral amorfo, se denomina **frente de mineralización** (Serrano y Mariñoso, 1990).

A medida que este frente se desplaza va dejando tras de sí matriz ósea mineralizada en forma de cristales de hidroxipatita. Una vez completado el depósito de hueso los osteoblastos que no se han incorporado a la matriz se aplanan y pasan a formar parte del endostio (lining cells). El conjunto de osteoclastos y osteoblastos que de manera coordinada actúan en una superficie ósea durante un ciclo de

remodelado recibe el nombre de **Unidad Multicelular Básica –BMU-** (Eriksen et al., 1994).

Las BMU se activan de manera asincrónica, por lo que mientras unos ciclos de remodelado se hallan en fase de reabsorción, otros se encuentran en fase de reposo o de formación. El nuevo segmento de tejido óseo que resulta de la acción de cada BMU se denomina **Unidad Estructural Ósea (BSU)**. El límite entre el hueso preexistente y la nueva BSU es identificable morfológicamente como una línea ondulada y recibe el nombre de **superficie de inversión o de cemento** (Gurley, 1992).

En la remodelación del hueso compacto los osteoclastos, partiendo de un canal de Havers o de Volkmann, excavan un túnel de sección circular. Por esta razón las BSU corticales, llamadas también **osteonas** (Gurley, 1992), tienen forma cilíndrica. En la remodelación del hueso esponjoso los osteoclastos labran, en la superficie de las trabéculas, excavaciones poco profundas y de base ancha. Por esta razón las BSU trabeculares llamadas también **paquetes trabeculares** tienen forma de lente plano-convexa. Se denomina **recambio óseo** (*bone turnover*) al volumen total de hueso que es renovado por unidad de tiempo mediante el remodelado (Serrano y Mariñoso, 1990). El recambio óseo es directamente proporcional al número de ciclos de remodelado en curso o, lo que es lo mismo, al número de BMU activas.

La diferencia entre el volumen de hueso formado y el de hueso reabsorbido, por unidad de tiempo, se denomina **balance óseo** (Serrano y Mariñoso, 1990). Si la reabsorción y la formación son idénticas, el balance es igual a cero y el volumen total de hueso (masa ósea) no variará en función del tiempo. Si la formación y la reabsorción no son iguales, la masa ósea se modificará en sentido positivo o negativo. El balance óseo corresponde a la suma aritmética del hueso ganado o perdido en cada ciclo de remodelado. Así pues, una vez instaurado un balance positivo o negativo la velocidad a la que se perderá o ganará masa ósea será directamente proporcional al número de BMU activas. La máxima masa ósea se alcanza a los 30 años de edad y depende de factores genéticos (gen del receptor de la vitamina D) y ambientales (ingesta de calcio, ejercicio físico).

De los 30 a los 40 años, el balance óseo es igual a cero y la masa ósea permanece estable. A partir de los 40 años se instaura un balance negativo y la masa ósea disminuye de manera progresiva. En el hombre, la pérdida se realiza a una velocidad constante (un 0,5% anual) mientras que en la mujer se acelera durante los años de la menopausia. Esta pérdida "fisiológica" de masa ósea determina que al inicio de la octava década los hombres hayan disminuido su masa ósea en un 20% y las mujeres en un 30%.

El remodelado óseo está sometido a un control sistémico (hormonas) y a un control local (factores locales). Los mecanismos de control de acción sistémica regulan el ritmo de activación de las BMU y la actividad funcional de las células que las integran. Son especialmente importantes la hormona paratiroidea y la vitamina D pero intervienen también las hormonas tiroideas, los esteroides sexuales, los glucocorticoides, la insulina y la hormona del crecimiento. La calcitonina aunque in vitro es capaz de modular la función de las células óseas parece que in vivo carece de importancia fisiológica.

Algunas de estas hormonas tienen una acción directa sobre las células óseas; otras actúan de manera indirecta modulando la síntesis o la actividad de factores locales (Eriksen et al., 1994). El control local del remodelado óseo se lleva a cabo a través de una serie de factores de crecimiento (insulina-like, transformantes de la familia  $\beta$ , fibroblásticos, derivados de las plaquetas) y citocinas (IL-1, IL-6, IL-11, factor de necrosis tumoral, factores estimuladores de colonias) de acción autocrina o paracrina (Elias et al., 1995; Watson et al., 1995; Pfeilschifter et al., 1995; Manolagas y Jilka, 1995).

Estos factores locales son producidos por las células óseas y las células medulares adyacentes (células hematopoyéticas, linfocitos, macrófagos). Los factores locales intervienen en el control de la actividad funcional de las células de las BMU y son clave para el acoplamiento entre osteoclastos y osteoblastos. Las células de linaje osteoblástico (lining cells) a través de la producción de factores locales (IL-6, IL-11) son capaces de activar a los osteoclastos y de esta manera contribuir al inicio de los ciclos de remodelado (Manolagas y Jilka, 1995; Elias et al.,

1995). A su vez, ciertos factores liberados por los osteoclastos o por la matriz ósea bajo la acción de estas células son capaces de activar a los osteoblastos.

Es probable que este fenómeno constituya el sustrato molecular para el acoplamiento entre la reabsorción y la formación dentro de los ciclos de remodelado. La mayoría de los datos que poseemos sobre la acción de los factores locales proceden de estudios in-vitro por lo que la importancia relativa de cada uno de estos factores in vivo se desconoce.

#### 2.3.4. Reparación ósea (*Fracturas*)

El tejido óseo es el único capaz de repararse a sí mismo de manera completa a través de reactivar los procesos que tienen lugar durante su embriogénesis. Cuando de manera brusca, un hueso es sometido a fuerzas que superan su resistencia mecánica aparece una línea de fractura. En primer lugar, en esta zona, se produce un hematoma que es reabsorbido por macrófagos. A continuación, aparecen células formadoras de hueso, procedentes de ambos lados de la línea de fractura. Estas células establecen puentes de tejido óseo inmaduro, sin orientación espacial definida (callo de fractura), que unen entre sí los extremos del hueso fracturado. En una fase posterior este hueso, a través de un proceso de modelado, es sustituido por otro, de tipo laminar, orientado según las líneas de fuerza que actúan sobre la zona (Vigorita, 2008).

La fatiga mecánica puede causar microfracturas trabeculares que no modifican la morfología externa del hueso. Estas fracturas microscópicas se reparan a través de microcallos de fractura que muestran una dinámica similar a la de los grandes callos (Vigorita, 2008).

#### **2.4. Interacción implante dental-hueso: biocompatibilidad**

La tolerancia hística (histocompatibilidad) de los biomateriales implantados se valora por las reacciones inflamatorias agudas o crónicas y la formación de fibras de colágeno periimplantarias –encapsulación- (Anderson y Miller, 1984; Autian, 1981; Bessing y Kallus, 1987; Bethmann y Knöpfler, 1987; Clark et al., 1974; Coleman et al., 1974; Eisenring et al., 1986; Geret et al., 1979; Kaminski et al., 1977; Keller et al., 1984; Munkelt et al., 1985; Rigdon, 1975; Sandrik et al., 1974).

El estudio histopatológico del lecho del implante, en los experimentos en animales con biomateriales, constituye el método más descrito en la literatura para valorar la biocompatibilidad. Como lugares de implantación se han elegido el tejido conjuntivo subcutáneo, la musculatura, la cavidad peritoneal, el tejido nervioso, las cavidades articulares y los huesos. Al valorar la histocompatibilidad conviene saber que las reacciones tisulares específicas de cada material son superadas por los procesos de cicatrización de la herida que ocurren tras el traumatismo quirúrgico o de la implantación. Los efectos específicos del material se pueden valorar, a lo sumo, 1 semana después de la implantación, ya que antes predominan los procesos de reparación tisular secundarios al traumatismo quirúrgico (Reuling, 1992).

La implantación de metales puros o aleaciones provoca una respuesta inflamatoria crónica en los tejidos blandos, que se conoce también como reacción a cuerpo extraño (Adams, 1976; Bagnalí, 1977; Cohen, 1959; Coleman et al., 1974; Hirsch y Johnson, 1984; Movat, 1985; Williams, 1971). Cuando se implanta titanio, tantalio, óxido de aluminio o cerámicas de fosfato cálcico en los huesos, se puede producir una cicatrización por tejido conjuntivo o hueso.

Brånemark (1985) denominó al contacto directo del hueso con el implante «osteointegración». Osborn (1985) señaló la influencia del material en las distintas reacciones tisulares. Los materiales examinados fueron clasificados por este autor en tres grados diferentes de biocompatibilidad: biotolerado, bioinerte y bioactivo.

Los datos de los estudios experimentales en animales han demostrado, entre tanto, que la cicatrización por tejido conjuntivo o hueso no depende del biomaterial, sino de la estabilidad biomecánica durante la fase de cicatrización (Donath y Kirsch, 1986). A su vez, la estabilidad biomecánica se relaciona con el grosor óseo del lecho del implante, el diseño del implante, la micromorfología de la superficie del implante y la congruencia entre el implante y el lecho óseo.

#### *2.4.1. Morfología del aparato de soporte dental*

La encía forma parte de la mucosa oral y se transforma en epitelio de la unión. Este epitelio se halla en íntima relación con el esmalte o cemento del diente y constituye una barrera mecánica entre la cavidad bucal colonizada por las bacterias

y el periodonto. Los epitelios gingivales, del surco y también de la unión mantienen su forma gracias al tejido conjuntivo y son irrigados a través de los vasos sanguíneos situados en el tejido conjuntivo. La encía posee una vascularización (plexo vascular) más rica que la mucosa alejada del diente (Lenz, 1975; Sharp, 1977). En las gingivitis se observa un aumento significativo del número de vasos como consecuencia de la apertura de los denominados capilares "durmientes". La densidad vascular en una papila interdental puede variar entre 33,5 y 1653,7 vasos por mm<sup>2</sup> (Donath y Schulze-Quester, 1983). La bolsa gingival, que se puede originar entre el epitelio y la sustancia dura dental ó también en el epitelio, se asocia a la proliferación horizontal y apical del epitelio.

#### *2.4.2. Morfología del lecho del implante*

La comparación directa entre el aparato de soporte dental y el lecho periimplantario sólo puede realizarse entre la encía y la mucosa periimplantaria. Después de la fase de cicatrización se advierte una zona de tejido conjuntivo entre la inserción apical del epitelio y el primer contacto óseo en los implantes que se insertan en un solo tiempo; esta misma zona se observa en el momento de la cicatrización del elemento transepitelial espaciador en los implantes de dos etapas (antes del cambio del pilar transepitelial). Los implantes de una sola fase pierden esta zona de tejido conjuntivo cuando se produce inflamación periimplantaria, mientras que los modelos de dos fases lo hacen cuando se cambia por primera vez el pilar transepitelial.

La zona de tejido conjuntivo tiene una composición diferente, va que consta de una porción interna (rica en fibras de colágeno) y otra externa (vascularizada y laxa). Las fibras de colágeno presentan una disposición fundamentalmente circular en los implantes de un solo tiempo quirúrgico (Buser et al., 1992) y paralela a la superficie del implante en los de dos tiempos.

#### *2.4.3. Histopatología comparativa del diente y del implante*

En general, la defensa frente a la inflamación se asocia al tejido conjuntivo vascular. Lo mismo ocurre en el caso de la encía. Cuando se produce una inflamación de origen bacteriano, se abren los denominados capilares durmientes y ocurre un denso infiltrado inflamatorio. Tras la fase exudativa, se inicia la fase

proliferativa (inflamación crónica) que termina con la formación de un tejido de granulación.

Las estructuras locales (*fibras* dentogingivales, hueso alveolar) son destruidas. La destrucción horizontal o vertical del alveolo dental ocurre a distancia del infiltrado inflamatorio por la activación de los osteoclastos. Los compuestos que estimulan los osteoclastos (como, p. ej., prostaglandinas e interleukinas) se originan en el foco inflamatorio. El aparato fibrilar transdental se forma de nuevo en todas las fases de destrucción del alveolo dental (función protectora).

Los vasos sanguíneos que previamente se hallaban en el espacio periodontal quedan ahora superficiales, entre los haces fibrilares. De esta manera, se garantiza la defensa frente a las infecciones en todas las fases de las enfermedades periodontales.

En los implantes intraóseos, la vascularización de los tejidos que rodea directamente el implante (y, por tanto la capacidad de defensa frente a las inflamaciones) depende únicamente del tejido conjuntivo subepitelial (lámina propia). El resto de las zonas del tejido conjuntivo próximas al implante constituyen un tejido cicatrizal -sin vasos sanguíneos- que aparece tras la reparación del implante.

El lecho óseo del implante, en comparación con el diente natural soportado por el ligamento periodontal (con vasos sanguíneos), no es tan capaz de defenderse frente a la infección.

El cierre epitelial de los distintos sistemas de implantación es variable: los sistemas bifásicos se asemejan, en cierto modo, a los monofásicos, hasta que se cambia por primera vez el pilar transepitelial. Cuando se cambia el pilar transepitelial, se destruye la zona de adherencia de tejido conjuntivo inicial (que casi siempre existe y está formado por tejido cicatrizal), con lo cual el epitelio comienza a proliferar sobre la superficie del pilar espaciador hasta el implante anclado en el hueso (la formación de bolsas depende de cada sistema).

#### 2.4.4. Reparación ósea. Fase precoz

La reparación ósea del implante va precedida, como todo proceso de cicatrización, del sangrado y la formación del coágulo de sangre. El coágulo de sangre (fibrina y células agregadas de la sangre) representa el tejido que guía la reparación tisular (tejido de granulación). La adherencia superficial del coágulo de sangre al implante es, por tanto, esencial para la reparación ósea (estructura de superficie, fuerzas adhesivas, etc.).

El coágulo de sangre se organiza a través de los capilares que lo atraviesan y de los preosteoblastos que lo acompañan (crecimiento óseo centrípeto). Además de la neo formación ósea, en esta fase precoz, el organismo es capaz de reconocer los cuerpos extraños (aparecen macrófagos y células gigantes multinucleadas). Con la aposición de hueso a la superficie del implante disminuye el número de macrófagos multinucleados (Sennerby et al., 1991). En principio, las interrelaciones entre el tejido y el material son difíciles de valorar en esta primera fase (superposición de los procesos inflamatorio agudo y de proliferación, que persigue la cicatrización de la herida).

#### 2.4.5. Reparación Ósea. Fase tardía

Dependiendo de la anchura de la hendidura que quede entre la superficie del implante y el lecho óseo, se puede establecer una adherencia directa a la cortical a través de la formación de hueso laminar concéntrico (hasta 0,2 mm). Las hendiduras de mayor dimensión son cubiertas por hueso reticular en un plazo de 14 días. Este hueso reticular se transforma aproximadamente a los 2 meses en un hueso laminar que contiene en su centro restos del hueso reticular.

El recubrimiento óseo completo no se produce con ningún implante. El contacto óseo alcanza un 56-85% con los implantes de tornillo (Sennerby et al., 1991) y un 82% con los implantes de lámina de Linkow (Linkow et al., 1992). En la zona de la superficie del implante, libre de hueso, las células grasas se adhieren al implante sin ninguna capa fibrosa de separación.

## 2.5. Fundamentos biológicos de la cicatrización de los implantes

### 2.5.1. *Inflamación crónica ante cuerpos extraños. Reacción a cuerpo extraño*

El organismo considera cuerpos extraños no sólo a todas las sustancias ajenas a él que son introducidas desde el exterior, sino también a sustancias propias que pierden su relación funcional con el ser vivo o que, por ejemplo, están constituidas por epitelio (queratina, mucina). Los cuerpos extraños exógenos y endógenos desencadenan una actividad fagocitaria y la reacción inflamatoria. Esta se mantiene hasta que se elimina o inactiva de alguna manera el cuerpo extraño.

La inflamación crónica causada por los cuerpos extraños endógenos y exógenos tiene una evolución diferente en los tejidos blandos y en el lecho óseo (Donath et al., 1992). Así, por ejemplo, la queratina del pilomatrixoma (tumor cutáneo) induce una inflamación en el tejido conjuntivo de la piel (con la aparición de linfocitos y macrófagos multinucleados). La queratina de un quiste odontogénico no provoca, en cambio, ninguna reacción inflamatoria manifiesta en la médula ósea.

Las masas de queratina son rodeadas por el hueso. La diferente respuesta tisular de los tejidos blandos y de los huesos a los cuerpos extraños se puede ampliar con otros muchos ejemplos. El curso biológico de la inflamación crónica, sobre todo de la reacción del hueso a los cuerpos extraños, cuya particularidad reside en la disminución de los macrófagos de la superficie del cuerpo extraño, a medida que se deposita el hueso, aún no se conoce bien, a pesar de una intensa investigación (Spector et al., 1989). La causa fundamental del desarrollo del tejido conjuntivo alrededor del cuerpo extraño (biomaterial) en los lechos óseos es la ausencia de estabilidad durante la fase de reparación. Los movimientos impiden la llegada de los capilares del lecho óseo y controlan la diferenciación de las células periimplantarias hacia fibroblastos u osteoblastos.

Las implantaciones realizadas en las especies humanas y de animales constituyen un experimento. Dependiendo del lugar de implantación (subcutáneo, intramuscular; intraóseo), se produce una respuesta diferente del tejido al mismo material, que es la reacción a cuerpo extraño.

### 2.5.2. Anclaje óseo del implante

En condiciones experimentales, los orificios taladrados en la cortical de menos de 0,2 mm de diámetro cicatrizan formando laminillas óseas concéntricas (hueso laminar). Los defectos mayores, de 0,3-0,6 mm, se regeneran a partir de trabéculas de hueso fibroso (hueso reticular). La formación de hueso tiene lugar a partir del periostio, endostio y sistema de Havers (Frost, 1982).

Durante la reparación ósea en torno a los implantes, cuando la hendidura de separación es fina, la formación de hueso se asemeja a la reparación primaria de una fractura ósea, aunque en este caso no se produce la callosidad (se forman puentes directos de hueso laminar a razón de aproximadamente  $1\mu\text{m}/\text{día}$ ). El proceso de reparación en las hendiduras anchas que rodean los implantes se asemeja al de la reparación secundaria de las fracturas óseas) ya que la formación de hueso tiene lugar a partir del callo fibroso y óseo -a razón de aproximadamente  $50-100\ \mu\text{m}/\text{día}$ - hueso reticular que se remodela posteriormente hacia hueso laminar.

Durante la preparación del lecho del implante se puede producir un traumatismo de los vasos sanguíneos periósticos, intracorticales e intraóseos. De ellos se origina la hemorragia que ocurre en la hendidura periimplantaria y permite una adherencia laxa de la fibrina a la superficie ósea y del implante. Este hematoma es sustituido por tejido de proliferación, que contiene capilares y fibras de colágeno, a los 6-14 días.

Dependiendo de la estabilidad del implante (el hueso sólo crece sobre una base sólida) se produce la aposición directa de hueso sobre el implante. La inestabilidad influye en la diferenciación celular y, por tanto, en la formación de hueso. Experimentalmente se ha hallado una correlación positiva entre el grado de movilidad y el desarrollo del tejido cartilaginoso o conjuntivo en el espacio periimplantario. Por consiguiente, para que ocurra el crecimiento óseo, son fundamentales el reposo mecánico y el aporte adecuado de sangre en todos los implantes.

La transformación ósea de la callosidad concluye a las 4-6 semanas. La

activación de los sistemas de Havers da origen a numerosos canales de reabsorción y se inicia el proceso de remodelado hacia el hueso laminar. Estos procesos de mineralización, que convierten la sustancia osteoide en sustancia ósea calcificada, ocurren con ritmo de 1  $\mu\text{m}$  al día (Frost, 1964). Si se tiene en cuenta que la anchura del espacio periimplantario clínico es de 50  $\mu\text{m}$ , se comprende por qué la fase de reparación exigida para los sistemas actuales de dos tiempos es de aproximadamente 3-4 meses.

### *2.5.3. Inflamación periodontal*

La periodontitis marginal profunda sigue una evolución en brotes, porque la inflamación es contenida por los vasos sanguíneos del ligamento periodontal. La evolución en brotes se explica por la interacción entre las defensas del huésped y la patogenia de las bacterias. A través de los vasos sanguíneos se activan las defensas humerales (inmunoglobulinas) y celulares (leucocitos) como consecuencia de los mecanismos inmunopatológicos (sistema de complemento).

Uno de los mecanismos de protección más importantes del aparato de sostén dental son las fibras supraalveolares (dentoalveolares y transdentales), que se forman de nuevo en todas las fases de degradación del hueso alveolar. De acuerdo con los estudios clínicos (de sondaje) estas fibras actúan como un soporte adicional. Por eso, conviene evitar el sondaje del aparato de sostén residual del diente (espacio periodontal, etc.).

### *2.5.4. Inflamación periimplantaria*

El tipo de inserción del epitelio del tejido conjuntivo a los márgenes del implante depende del modelo de implante intraóseo. Como consecuencia del mecanismo diferente de adhesión, se establecen diversas posibilidades de defensa frente a las infecciones. En los implantes de un solo tiempo, la defensa frente a las infecciones se garantiza en la zona marginal a través de los vasos de la lámina propia del epitelio, mientras que en los implantes bifásicos se observa una profunda bolsa epitelial en ausencia del tejido conjuntivo supracrestal (estado que aparece tras el cambio del pilar de conexión transepitelial).

Este largo epitelio puede propiciar una reacción de defensa frente a la inflamación, a través de los vasos sanguíneos de la lámina propia. Cuando el proceso inflamatorio supera la barrera mucosa, los microorganismos se introducen en el collarete cicatrizal de tejido conjuntivo en los implantes monofásicos y directamente en el lecho óseo en los de tipo bifásico. En estas condiciones, los dos modelos de implante muestran una capacidad limitada para defenderse frente a la inflamación. Por el momento, no existe ningún estudio clínico sobre cuál es el tipo de cierre de los tejidos blandos que se asocia a una mayor conservación a largo plazo del implante.

#### *2.5.5. Etiopatogenia de la Inflamación periimplantaria*

El tejido de defensa (tejido de granulación) se forma en todos los tipos de implante en la delgada capa de tejido conjuntivo vascular del epitelio (lámina propia). Este hecho significa que, cuando ocurre la contaminación bacteriana de la superficie del implante, se estimula la lámina propia que da origen al tejido de defensa subepitelial (tejido de granulación) que sigue a la infección bacteriana cuando esta supera la barrera mucosa e invade la superficie del implante.

El epitelio prolifera en dirección apical (crecimiento en profundidad del epitelio) y recubre el tejido de granulación. Las posibilidades son múltiples: el epitelio continúa proliferando en dirección apical en mayor medida que el tejido de granulación, o bien el tejido de granulación no epitelial se extiende apicalmente más allá del epitelio.

Sólo excepcionalmente se observa el cuadro de la osteomielitis periimplantaria descrito en los experimentos de Berglundh et al., 1991, 1992 y los de Ericsson et al., 1992.

#### *2.5.6. Pérdida del implante*

La causa fundamental de la pérdida de los implantes con aposición ósea es la inflamación de naturaleza bacteriana. En todos los modelos explantados sometidos a estudio histológico se han observado centenares de bacterias y cálculos en los bordes del implante y en las demás superficies de epitelio plano proliferante, macrófagos multinucleados, granulocitos, tejido de granulación y secuestros óseos

colonizados por bacterias. Sólo se detectaba hueso vital en la zona basal al foco inflamatorio.

Es curiosa la forma de los defectos óseos o focos osteolíticos, que probablemente dependen del diseño del implante. Los implantes de tornillo se asocian a lesiones osteolíticas planas con forma de cubeta y los cilíndricos a defectos profundos e infundibulares.

En el lugar del hueso reabsorbido aparece tejido de granulación que es recubierto por el epitelio plano proliferante por la cara del implante. El tejido de granulación que se forma para proteger de la inflamación procede de los márgenes del foco inflamatorio y sigue inmediatamente a las bacterias; la consecuencia es la osteomielitis periimplantaria. Ésta determina la pérdida del implante en cuestión de semanas.

## **2.6. Movilidad diente/implante**

La movilidad del implante se diferencia totalmente de la del diente, cuando se aplica una carga de manera lenta. La deflexión del diente cuando se aplica una carga experimental lenta se manifiesta básicamente, en dos fases; la inicial con una elevada flexibilidad (ligamento periodontal) y la segunda posterior con una marcada rigidez (deformación elástica del hueso alveolar y del diente). En la fase terminal no suele observarse ningún cambio adicional (Mühlemann, 1951). En cambio, la deflexión del implante, cuando se aplica el mismo experimento, se asocia a un comportamiento elástico lineal (Ney, 1986, 1987).

La movilidad vertical y horizontal de los diente, con respecto a los implantes, es de 10 a 100 veces mayor, debido a su diferente anclaje al hueso. Esta diferencia es el motivo por el que se afirma que las construcciones que ferulizan dientes con implantes provocan mayor estrés y fracturas que cuando se utilizan elementos amortiguadores. De todas maneras, cabe preguntarse si los resultados derivados de modelos teóricos y condiciones de experimentación estáticas son transferibles a la situación clínica, es decir, a las cargas fisiológicas. Se ha demostrado durante los estudios in vivo que durante la función masticatoria habitual en el diente apenas se producen movimientos (intrusivos) como consecuencia de la carga (Richter, 1992).

## 2.7. Carga Inmediata y tratamientos superficiales

La carga inmediata de los implantes dentales es una indicación primaria para un creciente número de casos clínicos. En la actualidad, se admite que el protocolo convencional, con un tiempo de espera entre 3 y 6 meses antes de cargar el implante, no está basado en una verdad indiscutible y ya no se considera como prerrequisito para la osteointegración. Basándonos en la observación clínica documentada de que hoy disponemos puede establecerse que la carga inmediata es la indicación primaria, siempre que se disponga de una estabilización óptima de los implantes en hueso de suficiente volumen y densidad y que las cargas estimadas no sean excesivas.

En los últimos años, con la estandarización de los tratamientos con implantes dentales, el conocimiento de la fisiología periimplantaria y los nuevos materiales, recubrimientos y diseños disponibles, se ha impulsado el desarrollo de este tipo de implantología con la consiguiente aparición de tratamientos más rápidos, eficaces y estéticos, con un alto porcentaje de éxito a medio y largo plazo. A pesar de ello todavía permanecen sin resolver un número importante de aspectos de importancia creciente como consecuencia de esta generalización.

Entre ellos podemos citar la consecución de una adecuada osteointegración en hueso de baja calidad o patológico (tumoral), la anómala evolución de la microestructura ósea en algunos diseños (reabsorción ósea) y, sobre todo, la creciente exigencia de absorción de carga inmediata por el implante, evitando varias sesiones quirúrgicas con el consiguiente costo y riesgo, así como dotando de casi-plena funcionalidad al paciente en el plazo más breve posible.

Todas estas novedades están cambiando los protocolos y diseños convencionales de implantación, en muchos casos sin un conocimiento claro de los porqués del éxito o fracaso de un diseño o protocolo quirúrgico determinado, siguiendo, aún hoy, un método esencialmente de prueba-error, a pesar de las tremendas campañas experimentales, seguimientos clínicos e inversión en el sector.

En concreto, en el protocolo de carga convencional el paciente es sometido a dos intervenciones para la colocación de un implante. En la primera de ellas se

coloca la pieza dentro del hueso, lo que se denomina propiamente implante (fabricado en titanio), y en una segunda intervención se coloca el emergente que es la pieza a la que va atornillada la pieza dental protésica. Con este protocolo de carga han de transcurrir habitualmente de 4 a 6 meses hasta que se supone que el implante de titanio se ha osteointegrado y por tanto, se puede colocar el emergente con la pieza dental. Por el contrario, en el protocolo de carga inmediata para que la osteointegración sea posible, no debe existir prácticamente desplazamiento relativo de la pieza de titanio con respecto al hueso, de manera que se produzca la formación del hueso alrededor de la rosca. Sin embargo, la existencia de un pequeño aunque no nulo desplazamiento relativo implante-hueso favorece una más rápida osteointegración.

Según Brånemark et al. 1983, el trauma quirúrgico junto con la carga inmediata del implante, provocarían el desarrollo de un recubrimiento de tejido cicatricial en la interfase implante/hueso. El protocolo implantológico convencional de Brånemark et al., 1977 fue cuestionado por Szmukler-Moncler, 1998, quién consideró que el tiempo de espera propuesto carecía de base científica. En un trabajo posterior Szmukler-Moncler et al., 2000, analizó las circunstancias iniciales adversas para la carga inmediata y cómo la suma de éstas daba lugar a un exceso de micromovimiento que alteraba la osteointegración normal.

Estudios experimentales adicionales de Sagara et al., 1993 y Zubery et al. 1999 en perros; y de Piatelli et al., 1998 y Romanos et al., 2002 en monos, avalaron también esta última afirmación al no encontrar tejido fibroso en la interfase.

En humanos, Testori et al., 2001, estudiaron dos implantes con carga inmediata extraídos tras 4 meses de función; el análisis morfométrico mostró una superficie de contacto del 78% al 85% entre hueso e implante. Es por todo ello que, en los últimos años, han aparecido diversos diseños de implantes (Babbush et al. 1986; Buser et al., 1991; Schnitman et al., 1990) que intentan conseguir micromovimientos entre implante y hueso dentro del rango establecido como favorable -aunque sin fundamento mecanobiológico contrastado- para carga inmediata de 50-150 micras.

Dentro de los parámetros que afectan al proceso de implantación y en concreto a la capacidad de carga inmediata, se pueden distinguir aquellos que dependen únicamente del diseño del implante y otros que dependen del entorno como pueden ser la ubicación del mismo (Ericsson et al. 2000; Ibáñez y Jalbout, 2002) y el estado del lecho óseo receptor.

### *2.7.1 Diseño geométrico*

Uno de los parámetros básicos en el éxito de un implante es su diseño geométrico, y dentro de éste, la unión entre las diferentes piezas que componen el implante, la longitud del mismo y las características de la rosca.

Los implantes rígidos son los históricamente más frecuentes; todas las piezas que los conforman están unidas rígidamente, sin existir movimiento relativo entre ellas ya que existen uniones roscadas que impiden la micromovilidad. En los procesos de carga inmediata se requiere que el micromovimiento relativo entre implante y hueso esté en un rango bajo de 50-150 micras. Esta restricción es muy importante en este tipo de implantes, ya que el implante rígido transmite toda la carga, desplazándose habitualmente más con respecto al hueso que los de tipo resiliente en los que las piezas componentes no conforman una pieza rígida sino que existen holguras y elementos de alta flexibilidad (juntas de silicona) que permiten movimientos relativos entre unas piezas y otras (Pérez del Palomar et al., 2005).

Otro parámetro importante es la longitud del implante. Así, Gatti et al., 2000, excluyeron a pacientes potenciales con una disponibilidad ósea mandibular incapaz de albergar fijaciones de al menos 10 mm de longitud y 3.3 mm de diámetro. Los implantes inmediatos mandibulares de Ericsson et al., 2000, siguen el mismo criterio de longitud, al igual que los 107 implantes de Tarnow et al., 1997, colocados en maxilar y mandíbula; y los 776 implantes del estudio de Chiapasco et al., 1997.

En cuanto a las roscas, para Saadoun y Le Gall., 1992, se logra un mayor grado de estabilidad primaria con implantes roscados de superficie rugosa. Muy similar es el criterio de May y Romanos, 2002, para los cuales la retención macromecánica y micromecánica del implante, es importante para su carga inmediata.

### 2.7.2. Tratamiento de la superficie

Distintos estudios han demostrado que el tipo de superficie del implante modifica la morfología de las plaquetas adheridas, su capacidad de agregación, la extensión de su adhesión y la producción plaquetaria de micropartículas. Además, el tipo de superficie también puede modificar el ambiente biomecánico al que se encuentran sometidas las células mesenquimales indiferenciadas y los osteoblastos derivados (Cano Sánchez et al., 2002).

Así, las superficies rugosas favorecen la migración y adhesión celular inicial a la superficie, así como la relación biomecánica entre el hueso y el implante, en función de la cantidad de hueso mineralizado que quede atrapado (estabilidad secundaria) (Engelke et al., 2002). Por otro lado, los osteoblastos producen más proteínas sobre superficies rugosas (Deporter et al., 2002), reconociendo éstos una superficie como rugosa cuando la altura de picos y valles es superior a 2 micras, y la distancia entre picos es superior a 10 micras (Rodan, 1992; Bianchi et al., 1997).

Ensayos experimentales *in vitro* han permitido concluir, al menos en las condiciones del ensayo, que oquedades en la superficie entre 1 y 5 micras de diámetro con forma esférica permiten que la mineralización de la matriz osteoide depositada en esas áreas aporte una mejor estabilidad y resistencia biomecánica (Deporter et al., 2002). Una irregularidad menor de 1 micra, originaría un crecimiento de hueso mineralizado muy fino, mientras que una mayor de 5 micras no permitiría una entrada de hueso retentivo óptima (Roccuzzo et al., 2001; Knabe et al., 2005).

Las técnicas habituales para tratar la superficie de los implantes con la finalidad de aumentar la superficie de contacto, se basan en obtener una microporosidad y rugosidad adecuadas. Para ello se aplican distintos mecanismos de tratamiento de superficie a través de técnicas de substracción o de adicción (TPS, SLA,...), consiguiéndose en la actualidad excelente estabilidad primaria (85% de contacto en la interfase) mediante la aplicación de técnicas mixtas de chorreado y grabado de la superficie mediante diversos ácidos.

## 2.8. Osteointegración y comportamiento mecánico de la interfaz

La osteointegración se define como la conexión directa entre implante y tejido vivo sin la presencia de ningún tejido fibroso entre ambos desde el punto de vista microscópico (Branemark, 1983). A pesar de las elevadas tasas de éxito que presentan en general los implantes dentales todavía se producen fallos de los mismos en la práctica clínica (Schwartz-Arard et al., 2005). Las causas que producen el fallo del implante son tanto mecánicas como biológicas.

Un proceso rápido de osteointegración está asociado a una correcta estabilización secundaria (Szmukler-Moncler et al., 1998; Spears et al., 2001). Para permitir la rápida adhesión de las proteínas, el crecimiento de las células y la formación de hueso, se requiere una estabilidad mecánica inicial que se consigue reduciendo los micromovimientos entre hueso e implante (Schenk y Buser, 2000; Donath, 1988; Davies, 1998). Bobyne et al. (1980), Estudiaron la influencia de utilizar implantes con diferente tamaño de poro en su acabado superficial sobre la osteointegración, obteniendo que el tamaño de poro óptimo se encuentra entre 100-400  $\mu\text{m}$ . Otros estudios han demostrado que un tamaño mínimo de poro entre 140-200  $\mu\text{m}$  favorece la aparición de osteonas que posteriormente dan lugar a la formación de tejido óseo (Hulbert et al., 1970; Klawitter y Weinstein, 1974; Li et al., 1997).

También se ha observado experimentalmente que un tamaño de poro muy grande puede producir el efecto contrario, ya que poros muy grandes pueden no llegar a ser colonizados para formar nuevo tejido óseo lo que impide la osteointegración y la consiguiente inestabilidad del implante (Soballe et al., 1992a). Otro aspecto que también puede influir favorablemente en el proceso de osteointegración es la utilización de recubrimientos de fosfato de calcio, el más conocido es la hidroxiapatita (HA), el cual mejora la osteoconductividad de los implantes metálicos (Geesink et al., 1997; Nguyen et al., 2004) y proporciona un ambiente que favorece la diferenciación de tejidos en la interfaz (Kieswetter et al., 1996).

Aunque los mecanismos por los que los recubrimientos de fosfato de calcio promueven la osteoconductividad no están todavía claros, tanto la química como la

geometría de la superficie se consideran que son características determinantes (Buser et al., 1991).

La forma más habitual de determinar el grado de osteointegración es mediante cortes histológicos de implante-hueso. Esta técnica implica el sacrificio del animal para obtener la muestra histológica. Sin embargo, existen otras técnicas incruentas que evitan dicho sacrificio. La primera de ellas consiste en la medición directa de los desplazamientos relativos entre implante y hueso por medio de un transductor de posición ó célula de carga, el cual se clava en el hueso del animal obligando a anestesiarlo cada vez que se desea medir, con el consiguiente riesgo de infecciones.

Otra de las técnicas está basada en la determinación de la frecuencia de resonancia en un implante (Huang et al., 2005). Consiste en un micromartillo electromagnético que colisiona con el implante, captándose el sonido mediante un micrófono anexo. Ambos están encapsulados al objeto de garantizar la repetibilidad de su posicionamiento. Este método mejora un sistema similar denominado OSSTELL (Osstell Integration Diagnostics, Göteborgsvängen, Sweden), cuyos resultados preliminares lo califican como una herramienta muy prometedora de cara a verificar *in vivo* la estabilidad de un implante dental.

De hecho, en la práctica clínica existe un método muy popular para este mismo fin, donde se percute con el dedo directamente sobre el implante, y el especialista, con su experiencia, interpreta el sonido que se emite. En este caso, al ser un micromartillo, la energía y velocidad con la que se percute es siempre fija, y el sonido resultante se analiza en el dominio de la frecuencia, teniendo una herramienta objetiva con sólida base científica.

Los distintos acabados superficiales, geometría, material del vástago, etc. no sólo determinan los aspectos biológicos que tienen lugar en la interfaz hueso-implante, también condicionan las propiedades mecánicas de la misma, fundamentales para la problemática del aflojamiento del implante. Existen diversos estudios experimentales que determinan las propiedades mecánicas de la interfaz

ante cargas de cizalladura (Soballe et al., 1992a; Soballe et al., 1992b; Soballe et al., 1993; Müller et al., 1994).

En estos estudios se dan propiedades de la interfaz como la tensión última y la rigidez de la interfaz a cizalladura, así como la energía de fallo de la interfaz. El rango de variación de las distintas propiedades mecánicas es muy importante, además de que sólo son valores en una dirección, sin saber lo que ocurre en la dirección perpendicular a la interfaz. Esta dispersión en los valores de las propiedades y también la falta de información condiciona el desarrollo de modelos computacionales, siendo necesario la realización de más ensayos y también de que éstos sean más específicos.

## **2.9. Tratamientos superficiales y biológicos**

Desde que los implantes intraóseos roscados tipo tornillo se impusieron mayoritariamente a las demás formas de implantología, se buscó la forma de potenciar su grado de adhesión mediante tratamientos superficiales, de la rosca principalmente. Así tenemos el revestimiento del implante por plasma de titanio, que aumenta la superficie del cuerpo de 6 a 7 veces (Steinmann, 1988; Testh, 1991; Kirch y Montag., 1986).

El revestimiento de hidroxiapatita, que en diversos estudios se demostró que se asocia a buenos resultados por espacio de aproximadamente 5 años, periodo de respuesta favorable en un 95% (Kirch y Ackerman, 1991; Kent, 1990; Krause., 1989). Sin embargo últimamente se han descrito cada vez más fracasos de los implantes recubiertos de hidroxiapatita y se evita su uso (Weinlaender et al., 1992; Johnson, 1992).

Se desarrollaron recubrimientos con las llamadas técnicas de sustracción, en contraposición del tratamiento del plasma y el recubrimiento de Ha, que son técnicas claras de adición, con sus seguidores y detractores. Entre éstas técnicas de sustracción tenemos el arenado ó chorreado, la corrosión mediante ácido, la suma de ambas y el tratamiento especial con láser. Agotado presumiblemente, el campo de los recubrimientos superficiales, los investigadores dirigieron su atención a la

mejora y/o aumento de los mecanismos intrínsecos de respuesta celular, fijándose en un elemento nuevo: la sangre y sus componentes.

Tayapongsak et al. 1994, introdujeron la novedosa idea de la aplicación de un coágulo de fibrina en la reconstrucción de defectos mandibulares junto con injerto óseo autógeno, identificando radiográficamente consolidaciones óseas tempranas en 33 casos, atribuyendo a la red de fibrina un incremento de la osteoconducción sobre las células osteocompetentes del injerto. También refieren su utilización como vehículo para la compactación de injertos, aunque ya se utilizara de manera rutinaria para este fin en traumatología durante las últimas décadas (Arbes et al., 1981).

El descubrimiento de factores de crecimiento en el adhesivo de fibrina autóloga (AFA), despertó el interés de los investigadores, en el sentido de utilizar este producto no sólo como agente osteoconductor y vehiculizador de injertos, sino como posible agente osteoinductor (Antonaides, 1981). Slater et al. (1995), en un trabajo *in vitro*, obtuvieron un aumento en la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos y un incremento en la síntesis de matriz extracelular cuando se cultivan dichos osteoblastos en presencia de factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).

Whitman et al., 1997, observó las diferencias entre el AFA y el plasma rico en plaquetas (PRP) y propuso algunas posibles aplicaciones del PRP en cirugía bucal y maxilofacial, como reconstrucciones mandibulares, procedimientos de elevación de seno, fisuras palatinas y procedimientos relacionados con la colocación de implantes.

Marx et al., 1998, aplicaron sus estudios sobre PRP, y observaron la existencia de un incremento del número de plaquetas en este concentrado de un 338% con respecto a los niveles basales plaquetarios, mostrando la presencia de al menos tres factores de crecimiento PDGF, TGF- $\beta$ 1 y  $\beta$ 2, y refiriendo la existencia de receptores en el hueso trabecular para dichos factores de crecimiento.

La utilización de este preparado junto con injerto óseo autógeno en reconstrucciones mandibulares demostró que producía una aceleración y aumento

en la densidad del hueso formado a los 6 meses respecto del grupo control, valorado mediante radiografías panorámicas. La activación del PRP la realizaban mediante la adición al preparado de trombina bovina.

Anitua, 1999, refirió la utilización del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en pacientes que presentaban enfermedad periodontal, susceptibles de tratamiento implantológico y en pacientes con fracturas verticales en dientes que se sustituirían mediante implantes unitarios, con resultados significativamente mejores, desde el punto de vista de la regeneración y maduración ósea con respecto al grupo control y exento de riesgos para el paciente.

La fibrina rica en plaquetas (PRF), desarrollada en Francia por Choukroun et al., 2001, es un concentrado de plaquetas de segunda generación utilizado para acelerar la cicatrización de los tejidos blandos y duros. Sus ventajas sobre el mejor conocido plasma rico en plaquetas (PRP) incluyen la facilidad de preparación y aplicación, y la falta de modificaciones bioquímicas (sin trombina bovina o anticoagulante). El PRF es una matriz de fibrina autóloga que contiene una gran cantidad de plaquetas, leucocitos y citoquinas (Choukroun et al., 2001; Choukroun et al., 2006; Diss et al., 2008; Braccini, 2009; Simonpieri et al., 2009; Jang et al., 2010).

### *2.9.1. Plasma rico en factores de crecimiento*

Los factores de crecimiento son polipéptidos, contenidos en diferentes tipos celulares y en la matriz extracelular, que juegan un papel fundamental en la estimulación y regulación de la curación de heridas en diferentes tejidos del organismo. Parecen regular diversos procesos celulares, como son la mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación y el metabolismo celular (Garg et al., 2000).

Estos factores de crecimiento se encuentran acumulados en los gránulos B de las plaquetas. En la actualidad se acepta que los factores de crecimiento tienen un papel esencial en el proceso de curación y formación tisular (Werner y Grose, 2003). En realidad, todos los estadios del proceso de reparación están controlados por una amplia variedad de citoquinas y factores de crecimiento actuando localmente como reguladores de las funciones celulares más básicas, usando mecanismos endocrinos, paracrinos, autocrinos e intracrinos.

Los factores de crecimiento influyen en mucho de los procesos comunes de la reparación tisular y las enfermedades, incluyendo la angiogénesis, quimiotaxis y proliferación celular, además del control de la síntesis y degradación de las proteínas de la matriz extracelular (Anitua et al., 2006).

Su modo de acción se realiza al unirse a su receptor extracelular que va a activar la vía intracelular de transducción de señales (Liebermann et al., 2002; Tabata, 2003). El descubrimiento de muchas de las funciones de los factores de crecimiento en la reparación tisular ha llevado a la conclusión de que el control temporal de su expresión es crucial en algunas intervenciones quirúrgicas y en el tratamiento de los desórdenes músculo-esqueléticos, incluyendo fracturas óseas, defectos de cartílagos y lesiones musculares o tendinosas (Luginbuehl et al., 2004).

Las plaquetas son fragmentos anucleares de los megacariocitos, con una forma discoide y cuya concentración normal en sangre se ha considerado habitualmente de 150.000-400.000/ $\mu$ l ó  $1,5-4 \times 10^6$ /ml. Cuando se produce una herida, a la membrana plaquetaria se une el factor plasmático de Von Willebrand (a través de la glicoproteína Ib) que hace que se unan al colágeno expuesto de la pared vascular (adhesión), y de esta manera se unan entre sí (agregación). La agregación entre plaquetas se hace a través de puentes de fibrinógeno entre glicoproteínas de membrana (glicoproteína IIb-IIIa).

La activación (degranulación) de las plaquetas se puede realizar por varios mecanismos mecánicos o químicos: uno de los más fuertes es la adhesión de las plaquetas al colágeno y otros componentes del subendotelio, o por la presencia de trombina. Todos los mecanismos de activación plaquetaria, al parecer, lo hacen activando fosfolipasas de la membrana celular que promueven la liberación de  $Ca^{2+}$ , el cual por sí solo produce agregación y secreción. La degranulación plaquetaria libera tromboxano A<sub>2</sub> (Tx A<sub>2</sub>), adenosindifosfatos (ADP) y serotonina que estimulan el reclutamiento y activación de las plaquetas circundantes. También van a contener fibrinógeno, fibronectina e interleukinas 1, 3 y 6. Cuando se activan las plaquetas asumen una morfología esférica y espinosa con movimientos de pseudópodos y expulsión de los gránulos (Esnaola, 1998).

Después de agregarse y activarse las plaquetas se liberan nuevos factores agregantes, que, junto con la fase plasmática de la coagulación van a originar la formación de trombina y posteriormente la sustitución del fibrinógeno soluble por la red de fibrina. En los gránulos alfa liberados por las plaquetas se van a encontrar una serie de factores de crecimiento (Mundy, 1992; Anitua, 2001).

Los diferentes tipos de factores de crecimiento son los siguientes:

- **Factor de crecimiento transformante B (TGFB):** descrito inicialmente en células que presentaban transformación maligna (sarcomas). Es una superfamilia que se detecta en el hematoma de fractura en las primeras 24 horas- Presenta 5 isoformas, pero las forma B1 y B2 han sido las más investigadas por lo que de manera general se refiere de manera conjunta las 2 isoformas como el TGFB.

Los TGFB1 y TGFB2 se encuentran en las plaquetas principalmente y también en los macrófagos, linfocitos, neutrófilos, MSCs, osteoblastos (que lo producen con un efecto autocrino) y la matriz ósea. Van a actuar de manera paracrina o autocrina y su principal función es la quimiotaxis y diferenciación de las MSCs, y para la producción de colágeno por parte de los osteoblastos. Favorece también la angiogénesis. Inhiben la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea (Marx, 1999). No es bien conocido pero parece que tiene un efecto mitogénico en las células mesenquimales e inhibitorio de la proliferación en células epiteliales y dependiente de la presencia de otros GFs.

- **Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF):** presenta 3 isoformas AA, AB y BB. Actúan en las células a través de un receptor tirosinquinasa que pueden ser de tipo a y unirse a las cadenas A y B, o de tipo b que sólo se unen a cadenas b. Principalmente producido por las plaquetas. También se produce en macrófagos, osteoblastos (isoforma BB), condrocitos, fibroblastos y las células endoteliales. Facilita la angiogénesis por vía indirecta a través de los macrófagos que actúan sobre las células endoteliales, realiza un efecto quimiotáctico y activador sobre las células de inflamación (macrófagos), favorece la quimiotaxis y proliferación de células

mesenquimales (mitogénico), y facilitan la formación de colágeno tipo I por parte de los osteoblastos. Se achaca a este factor el 50% del efecto mitogénico proveniente de las plaquetas, el resto correspondería a otros GFs (Ross et al., 1986). Se considera que en la sangre normal existen 0,06 ng de PDGF por millón de plaquetas o 1200 moléculas de PDGF por plaqueta (Barnes et al., 1999; Marx, 1999).

- **Factor de crecimiento fibroblástico (FGF):** Su efecto sobre los fibroblastos fue la primera de sus funciones descrita, lo que le valió el nombre. La forma II o básica parece que es la más potente en la función mitogénica. Hoy se sabe que actúa también sobre otras células. Es producido no sólo por los fibroblastos sino también por los macrófagos, osteoblastos, plaquetas y células endoteliales a lo largo del proceso de curación ósea. Parece que aumenta la proliferación y diferenciación de osteoblastos y la inhibición de osteoclastos. Actúan sobre los fibroblastos aumentando su proliferación y la producción de fibronectina. También favorecen la angiogénesis por su acción mitogénica y quimiotáctica sobre las células endoteliales.
- **Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF):** con una semejanza del 50% con la insulina, se encuentra en el torrente circulatorio unido a proteínas de unión específicas. Producido por las plaquetas, macrófagos, osteoblastos y MSCs, también se encuentra en la matriz ósea. De manera autocrina o paracrina estimula la proliferación (mitogénesis) y diferenciación de las MSCs y de las células de revestimiento, así como la formación por parte de los osteoblastos de osteocalcina, fosfatasa alcalina y de colágeno tipo I durante el remodelado óseo (Marx, 1999).
- **Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF):** proteína que presenta 4 isoformas. También llamado factor de permeabilidad vascular o VPF. Actúa sobre la quimiotaxis y la proliferación de las células endoteliales. Realiza una hiperpermeabilidad de los vasos. Producido por varias células, entre ellas las plaquetas, macrófagos, osteoblastos y las células musculares lisas, sobre todo en estados de hipoxia. Su acción parece que está regulada por la acción de TGFB y PDGF. Existen 0.0006 ng de VEGF por millón de plaquetas (Banks et al., 1998; Lakey et al., 2000).

- **Factor de crecimiento epidérmico (EGF):** descrito por primera vez en la glándula submaxilar, tiene una gran similitud con el TGF $\alpha$  lo que hace que se unan al mismo receptor. Su acción parece que también está regulada por la acción de TGF $\beta$  y PDGF. Su función es mitogénica, proapoptótica, migración y de diferenciación, no sólo de las células epiteliales, sino también de fibroblastos, células del cristalino, células renales y células gliales a partir de células mesenquimales (Bolufer, 1988). El mecanismo de acción de los distintos GFs sobre las células es bastante similar aunque todavía no se conocen las moléculas exactas y los caminos específicos de cada factor de crecimiento. Por otro lado, diferentes GFs pueden producir efectos biológicos opuestos en las mismas células (por ejemplo, PDGF y TGF $\beta$ ). En el torrente circulatorio y la matriz extracelular se unen a proteínas específicas poco conocidas que impiden su rápida degradación. De manera general, los GFs actúan a nivel de la membrana celular a través de receptores específicos, los cuales se activan iniciando en el citoplasma una actividad de fosforilación del tipo tirosina-kinasa (PDGF, FGF, IGF, VEGF, EGF) o bien seronina-treonina-kinasa (TGF $\beta$ , BMPs), que activan específicos mecanismos de transducción de señales que se introduce en el núcleo para la expresión de genes específicos. El efecto final producido es multifuncional y va a depender de la célula diana y del estado fisiológico de la misma, de la relación con otras células, la matriz extracelular y la presencia de otros factores (Martín, 1995; Martínez-Valverde y Lorenzo, 1999).

El mecanismo de acción de los distintos factores de crecimiento (FC) sobre las células es bastante similar (figura 2). Por otro lado, diferentes factores de crecimiento pueden producir efectos biológicos opuestos en la misma célula (p. ej. PDGF y TGF). En el torrente circulatorio, la matriz extracelular se une a proteínas específicas poco conocidas, que impiden su rápida degradación.

<b>Factor de crecimiento de transformación <math>\beta</math></b>	<b>Isoformas</b>	5 isoformas. $\beta 1$ y $\beta 2$ son las más estudiadas
	<b>Células productoras</b>	Plaquetas, macrófagos, linfocitos neutrófilos, MSCs, osteoblastos, matriz ósea.
	<b>Función</b>	Quimiotaxis, diferenciación de las MSCs, producción de colágeno por osteoblastos, favorece la angiogénesis, inhibe la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea (Marx, 1999). Tiene efecto mitogénico en las células mesenquimales e inhibe la proliferación en células epiteliales dependiendo de la presencia de otros factores de crecimiento.
<b>Factor de crecimiento de origen plaquetario</b>	<b>Isoformas</b>	3 isoformas: AA, AB y BB
	<b>Células productoras</b>	Plaquetas (principalmente) macrófagos, osteoblastos (isoforma BB) condrocitos, fibroblastos y células endoteliales.
	<b>Función</b>	Facilita la angiogénesis por vía indirecta a través de los macrófagos que actúan sobre las células endoteliales, efecto quimiotáctico y activador sobre las células de inflamación (macrófagos); favorecen la quimiotaxis y proliferación de células mesenquimales (mitogénico); facilita la formación de colágeno tipo I; 50 % del efecto mitogénico proveniente de las plaquetas (Ross, 1986; Barnes, 1999).
<b>Factor de crecimiento fibroblástico</b>	<b>Isoformas</b>	2 isoformas. Tipos I y II. La forma II o básica parece que es la más potente en la función mitogénica.
	<b>Células productoras</b>	Fibroblastos (principalmente), macrófagos, osteoblastos, plaquetas y células endoteliales.
	<b>Función</b>	Aumentan la proliferación y diferenciación de osteoblastos y la inhibición de osteoclastos. Actúan sobre los fibroblastos aumentando su proliferación y la producción de fibronectina. Favorece la angiogénesis por su acción mitogénica y quimiotáctica sobre células endoteliales.
<b>Factor de crecimiento similar a la insulina</b>	<b>Isoformas</b>	2 isoformas. Tipo I y II.
	<b>Células productoras</b>	Plaquetas, macrófagos, osteoblastos, MSCs y matriz ósea.
	<b>Función</b>	Estimula la proliferación (mitogénesis) y diferenciación de las MSCs y de las células de revestimiento, así como la formación por parte de los osteoblastos de osteocalcina, fosfatasa alcalina y de colágeno tipo I; induce la diferenciación de MSCs y de las células de revestimiento, durante el remodelado óseo, al igual que las BMPs y el TGF $\beta$ (Marx, 1999)
<b>Factor de crecimiento epidérmico</b>	<b>Isoformas</b>	1 isoforma. Gran similitud con el TGF alfa, lo que hace que se unan al mismo receptor.
	<b>Células productoras</b>	Plaquetas, fibroblastos, células endoteliales.
	<b>Función</b>	Tiene función mitogénica, proapoptótica, migración y de diferenciación no sólo de las células epiteliales, sino también sobre fibroblastos, células renales y células gliales a partir de células mesenquimales.
<b>Factor de crecimiento endotelial vascular</b>	<b>Isoformas</b>	4 isoformas. También denominado factor de permeabilidad vascular (VPP).
	<b>Células productoras</b>	Plaquetas, macrófagos, osteoblastos y células musculares lisas, sobre todo en estados de hipoxia.
	<b>Función</b>	Actúan sobre la quimiotaxis y la proliferación de las células endoteliales, realiza una hiperpermeabilidad de los vasos. Su acción parece estar regulada por la acción de TGF $\beta$ y PDGF (Banks, 1998; Lakey, 2000).

**Figura 2.-** Factores de crecimiento plaquetarios incluidos en el PRP. Tomado de: Martínez-González JM et al. Medicina Oral 2002;7:375-390

## 2.10. Evolución histórica.

Los factores de crecimiento fueron descubiertos en 1982 por Knighton (Knighton et al., 1982). En los años 90, el grupo de investigadores dirigido por Marx et al., 1998 estudiaron el comportamiento del elemento de la sangre responsable de la reparación celular, “las plaquetas”, encontrando tres factores de crecimiento. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Factor de crecimiento transformante tipo B1 (TGF B1) y factor de crecimiento transformante B2 (TGFB2). Otros autores describen siete factores de crecimiento (Anitua, 2001).

## 2.11. Aplicaciones médicas del plasma rico en factores crecimiento.

Los factores de crecimiento son utilizados de forma progresiva en medicina para favorecer la curación de heridas y la formación de nuevos tejidos. Los desórdenes músculo-esqueléticos son una de las causas de mayor morbilidad. Además, tienen un importante impacto en la calidad de vida, incluyendo discapacidad. Con consecuencias económicas. La importancia de este problema queda expresada por el incremento del número de pacientes que sufren enfermedades articulares y fracturas por osteoporosis.

Además, las lesiones músculo-esqueléticas derivadas de las actividades deportivas y los accidentes de tráfico también contribuyen al incremento del coste socio-sanitario y financiero.

El uso del plasma rico en plaquetas ayuda a suplir muchos de estos requerimientos, particularmente como ayuda a la regeneración ósea. Muchos estudios *in vitro* han demostrado, claramente, que los factores de crecimiento derivados de las plaquetas estimulan la proliferación de células formadoras de hueso trabecular humano (Gruber et al., 2002). Así, por ejemplo, Arriaza et al., 2005, realizó inyecciones percutáneas de Plasma rico en factores de crecimiento en pacientes que había sufrido fracturas de huesos largos, asociándolo a la terapia con ondas de choque, obteniendo buenos resultados.

También se está usando el plasma rico en factores de crecimiento en desórdenes de los tejidos blandos, incluyendo en estos las lesiones en tendones, ligamentos o discos articulares, lo que representa el 45% de todas las heridas músculo-esqueléticas registradas cada año en Estados Unidos, sobre todo en personas que practican deporte (Praemer, 1999).

En relación a esta cuestión, el grupo de investigación del doctor Anitua, realizó estudios sobre los efectos de los factores de crecimiento liberados por las plaquetas en la biología de las células tendinosas, para probar el potencial terapéutico del PRGF (Anitua et al., 2005). El conjunto de los factores de crecimiento liberados incrementan significativamente, *in vitro* la proliferación de células tendinosas humanas y estimulan la producción de factores angiogénicos como el VEGF (Factor de crecimiento Endotelial Vascular) y el HGF (Factor de Crecimiento Hepático) (Anitua et al., 2007).

Además, el HGF es un potente agente antifibrótico que puede reducir la formación de cicatrices alrededor del tejido tendinoso, lo que supondría una reparación de calidad inferior. Asimismo, el grupo del doctor Anitua cultivó células tendinosas en matrices de fibrina autóloga. Simulando las condiciones de las células *in vivo*. Sus resultados mostraban que el uso de matrices de fibrina rica en plaquetas es una estrategia segura y efectiva para acelerar la proliferación de células

tendinosas, estimular la síntesis de colágeno tipo 1 y promover la neovascularización tanto in vitro como in vivo (Anitua et al., 2006).

Además, la efectividad y seguridad de las preparaciones de plasma rico en plaquetas para el tratamiento de las ulceraciones ha sido recientemente publicado. Así, por ejemplo, el grupo de estudio de Steed, 1995, realizó un experiencia sobre 118 pacientes con úlceras crónicas de al menos 8 semanas de evolución. Después de dejar libre la herida de tejido infectado y necrótico, fueron tratados con factores de crecimiento derivados de las plaquetas, durante un máximo de 20 semanas.

Concluyeron que una aplicación tópica diaria del preparado del plasma rico en factores de crecimiento era un método seguro y efectivo para la estimulación y la curación de las úlceras diabéticas en miembros inferiores. Otros estudios (Escotto et al., 2001; Martí-Mestre et al., 2005), concluyeron que los factores de crecimiento eran una alternativa más al tratamiento de las úlceras de miembros inferiores. La explicación a este fenómeno la encontramos en que, al analizar histológicamente los tejidos de las heridas crónicas, se observa que hay muy poca celularidad, pocos fibroblastos, escasos capilares neo-formados y pocas células inflamatorias, mientras que los tejidos cicatrizados se caracterizan por un infiltrado de mononucleares y macrófagos, fibroblastos en división y numerosos capilares.

La cicatrización es un proceso complejo que involucra a diferentes factores. Después de una lesión, una serie de enzimas séricas se activan en cascada iniciando el proceso de cicatrización. La cascada de la coagulación controla la hemorragia en el espacio de la herida y, los mismos factores que activan esta cascada, también activan el sistema fibrinolítico, el cual modula el proceso de coagulación. El sistema del complemento es activado de la misma forma, lo que resulta en la formación del C5a, el cual es el factor quimiotáctico para neutrófilos. Además, la activación de la cascada de las cininas permite la formación de potentes vasodilatadores que proveen de sangre y otros factores para la cicatrización de la herida.

Estas enzimas interaccionan con el ambiente local, lo que atrae diferentes células a la herida, incluyendo plaquetas, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales. El ambiente de la herida es regulado por productos

plaquetarios durante las primeras 24 horas de la herida y posteriormente por los monocitos, que se convierten en macrófagos de la herida. Las plaquetas y subsecuentemente los macrófagos, liberan factores de crecimiento en la herida, influenciando condiciones en ésta hasta que cicatriza.

Los factores de crecimiento son polipéptidos que regulan el crecimiento, diferenciación y metabolismo de varias células, actuando como factor mitógeno y quimiotáctico para neutrófilos y monocitos, estimulando la migración y proliferación de fibroblastos que permiten la síntesis y depósito de colágeno. También son factores quimiotácticos y mitógenos para las células endoteliales y epiteliales.

Cuando se utilizan ratones y ratas diabéticos alterados genéticamente, usando estreptozotocina, se observa retraso significativo en la cicatrización comparado con los controles no diabéticos. El mecanismo exacto por el cual los diabéticos no cicatrizan es desconocido. Hay múltiple hipótesis como la glicosilación de proteínas estructurales importantes, factores de crecimiento, disminución de la liberación de oxígeno en el ámbito periférico por el engrosamiento de las membranas basales a nivel microvascular así como el déficit en la producción de factores de crecimiento específicos o falta de disponibilidad de estos en el sitio de la úlcera.

El plasma rico en factores de crecimiento también se está utilizando en cirugía ortopédica y articular. El estudio publicado por Everts et al. 2006, se realizaron 165 artroplastias total de rodilla, usando en 85 el plasma rico en factores de crecimiento en su forma de gel, observaron que, los pacientes a los que les habían añadido el gel necesitaban menos transfusiones de sangre que los del grupo control.

En otros ámbitos de la medicina, como es el caso de la cardiología, el plasma rico en factores de crecimiento se ha utilizado para tratar las heridas infectadas tras una cirugía cardíaca. Estas complicaciones en las heridas, supone un aumento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes, y se traduce en una prolongación de la estancia hospitalaria y como consecuencia en los costes de la cirugía. La incidencia de complicaciones de la esternotomía varía ampliamente, oscilando entre un 0,16%

en la cirugía congénita hasta un 4,5% en la cirugía de revascularización miocárdica (Oakley, 1996; Ridderstolpe et al., 2001).

El grupo de trabajo de Tomasa Centella, 2005, utilizó el plasma rico en factores de crecimiento para el tratamiento de 2 pacientes con infección profunda de esternotomía, 2 pacientes con fístula esternal y otros 2 con heridas profundas de la safenectomía, concluyendo que el plasma rico en plaquetas parece producir una aceleración de la cicatrización en heridas profundas, además de disminuir el tiempo de estancia y facilitar el trabajo de enfermería en pacientes con heridas infectadas tras cirugía cardiaca.

Otra de las especialidades médicas en las que se utiliza el PRP de manera exitosa es en la medicina y cirugía estética. La medicina antienvjecimiento ha cobrado auge, tanto por su continente (denominación y divulgación) como por su contenido (procedimientos diagnósticos, preventivos y terapéuticos). El uso del PRFC en la medicina antienvjecimiento está basado en la bioestimulación, conjunto de procedimientos para activar biológicamente las funciones anabólicas del fibroblasto, para que se produzca fundamentalmente colágeno tipo III, elastina y ácido hialurónico. Además, en esta especialidad médica, se utiliza el PRFC en sus distintas formas de aplicación (García-Giménez y González, 2005; Hernández et al., 2005):

- Terapia tópica en forma de coágulo para reparación cutánea.
- Terapia subdérmica (infiltración con adipocitos) para relleno de surcos o cicatrices deprimidas, para remodelación local o para reparación en paniculopatía edematofibroesclerótica (celulitis).
- Terapia intradérmica (a modo de mesoterapia) para bioestimulación cutánea.
- Terapia tópica después de la exfoliación química (por pulverización) para bioestimulación cutánea.

## **2.12. Aplicaciones del plasma rico en factores de crecimiento en odontología y cirugía maxilofacial.**

En el ámbito odontológico, el uso que se le ha dado al plasma rico en factores de crecimiento es muy variado. Por ejemplo, se ha empleado el plasma rico en plaquetas en el tratamiento de las sinusitis crónicas de los senos paranasales. Este tipo de sinusitis, puede dar lugar a complicaciones intracraneales como meningitis, trombosis de los senos venosos, absceso cerebral, absceso epidural y empiema subdural; pero también puede dar lugar a complicaciones extracraneales como mucocelos, osteomielitis, además, de complicaciones orbitarias. En el tratamiento de la peri-implantitis, ya sea con el uso de membranas o sin ellas, (Fontana et al., 2004; Sánchez et al., 2005; Casati et al., 2006; You et al., 2007).

En cirugía maxilofacial, para aumentar la eficacia de los procedimientos de elevación del seno maxilar (Moro et al., 2003; Kassolis y Reynolds., 2005; Schaaf et al., 2008; Torres et al., 2009) utilizando el PRP en asociación con hueso autólogo (Klongnoi et al., 2006; Consolo et al., 2007; Yilmaz et al., 2007; Roldan et al., 2008; Aimetti et al., 2008), en combinación con algún tipo de membrana (Garg et al., 2000).

Se ha analizado el uso del Plasma Rico en Factores de Crecimiento como prevención de la alveolitis seca después de la exodoncia de terceros molares. Los autores, observaron mejor hemostasia, mejor aspecto del colgajo, menos dolor según una escala EVA, y menor incidencia de la alveolitis seca (Mancuso et al., 2003). En el campo de la periodoncia, Okuda y Kawase, 2003, han demostrado también la elevada concentración de PDGF y TGF-beta en el PRP, así como su elevada capacidad reguladora de la síntesis de colágeno en la matriz extracelular (Kawase et al., 2003).

En combinación de injerto óseo más implantes (Garg et al., 2000; De Obarrio et al., 2000; Mazor et al., 2004; Sánchez et al., 2005; Thor et al., 2005; Mannai, 2006; Ito et al., 2006; You et al., 2007; Del Fabro et al., 2009), incorporaron el PRP a un aloinjerto de hueso combinado con técnicas de Regeneración Tisular Guiada para tratar defectos intraóseos.

Estudios en animales de experimentación (perros), a los que se les creaba defectos supraalveolares de 5 mm a partir de la línea amelocementaria, se les añadió al PRP + Bio-Oss a las 6 semanas se sacrificaban los animales y se estudiaron al microscopio óptico. Los resultados obtenidos consistían fundamentalmente en el aumento de formación de hueso, cemento y ligamento periodontal, aunque se requieren más estudios para un mejor conocimiento del proceso (Moreno Reyes et al., 2004).

Otros trabajos han utilizado el PRP o el gel de fibrina en el manejo de defectos de recesión gingival, aisladamente o en combinación con diferentes técnicas de Regeneración ósea Guiada y distintos biomateriales. Pero sugieren asimismo que hay que seguir profundizando en el estudio (Dugrillon et al., 2002; Lekovic et al., 2002).

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en el presente estudio son:

- Evaluar la fuerza necesaria para la desinserción (torque) de implantes sin tratamiento de superficie o tratados con CLP o con CMN.
- Establecer el grado de maduración ósea a nivel del cuello y de la rosca de los implantes y determinar la posible influencia del tratamiento de superficie con CLP o CMN sobre la misma.
- Estudiar el desplazamiento medio de los implantes, con y sin tratamiento de superficie, dentro del lecho óseo tras su sometimiento a fuerzas de carga en distintos períodos: momento de colocación del implante y a los 7, 14, 21 y 28 días.

MATERIAL Y  
MÉTODOS

## 1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Para la realización de este estudio, se dispuso de 31 conejas neozelandesas debidamente identificadas, provenientes del animalario de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza o de la Granja San Bernardo (Zaragoza). Las conejas tenían un peso comprendido entre los 3.0 y 4.0 kilogramos y una edad media de 9 meses.

Sobre estos animales se colocaron un total de 62 implantes de titanio de 8 mm. de longitud por 3.75 de diámetro, Sistema Restore de Lifecore (Lifecore biomedical Inc. 3515 Lyman Blvd. Chaska Mn 55318 USA), implantes de Ti CP titanio, grado 4 y mecanizados en frío.

Los animales fueron recepcionados e identificados, adjudicándoseles un número que se escribía en el interior de ambas orejas con rotulador indeleble y que correspondía con su ficha y con el libro de registro del quirófano. Se mantenían estabulados una semana antes, para así lograr su acomodación al recinto. Se les alimentaba con una mezcla de vegetales verdes los primeros días y pienso los siguientes, con un dispensador de agua "*ad libitum*": un sistema automático efectuaba descargas de agua a presión para la limpieza de las jaulas varias veces al día.

La elección de la coneja como animal de experimentación se debió a varios factores: disponibilidad, manejabilidad y economía. Para nuestro estudio, el hecho de que fueran lagomorfos (roedores), no representaba un obstáculo ya que se iba a centrar la experiencia en los huesos de las patas traseras y los implantes no iban a ser cargados. Existen estudios en los cuales implantes no cargados muestran un aumento significativo del tejido óseo y en la densidad comparado con las características del hueso a distancia del implante (Melsen y Costa., 2000; Melsen y Lang, 2001).

Previamente a la realización de estos estudios, se elaboró un protocolo de experimentación animal que fue aprobado por el comité ético de la Unidad Mixta de Investigación (U.M.I.) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza (Anexo I). Además esta investigación sigue las directrices marcadas por el Real Decreto 223/88 que sólo permite la experimentación animal en recintos

homologados, con personal competente y experimentado (Real Decreto 223/1988, 1988).

La Diputación General de Aragón dispone de un centro al servicio de la investigación biomédica y de biomateriales cuyo nº de alta de usuario es el 50.297-18 A (Anexo II).

Según el tipo de estudio a realizar, las 31 conejas fueron divididas en dos grupos:

- Grupo primero. Compuesto por 17 conejas en las que se colocaron 34 implantes y en los que se valoró:
  - la fuerza de desinserción (torque) de los implantes y
  - el grado de maduración ósea a nivel del cuello y a nivel de la rosca del implante.
- Grupo segundo. Compuesto por 14 conejas en las que se colocaron 28 implantes en las que se determinó el desplazamiento del implante dentro del lecho óseo tras el sometimiento a carga.

En ambos grupos se establecieron, a su vez, tres subdivisiones de acuerdo a si no recibieron ningún concentrado (grupo control), fueron tratados con concentrado leucoplaquetar [CLP] (Patente I) o con un concentrado de células mononucleares [CMN] (Patente II).

## **2. EXTRACCIÓN DE SANGRE Y OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO LEUCOPLAQUETAR (CLP) Y DE LA FRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES (CMN)**

### **2.1. Zona de punción**

La zona de la oreja donde se iba a realizar la punción era rasurada. A continuación, se administraba una pomada vasodilatadora (EMLA, laboratorios Astra Zeneca) para conseguir aumentar el calibre de la vía, ya que no es posible la aplicación de una goma de compresión.

Se realiza la punción y se canaliza la vía con un Introcan del nº 20 G (Laboratorios B. Braun). Seguidamente se coloca una gasa con solución antiséptica (Betadine), para comprimir la arteria después de la extracción sanguínea.

De cada animal se obtuvieron viales de sangre con anticoagulante, sistema vacutainer de 3 ml. K3E 5.4 mg. (Laboratorios Becton-Dickinson). Cada vial sirve para incubar 2 implantes.

## 2.2. Obtención de concentrados sanguíneos

Para la obtención del concentrado leucoplaquetar (CLP) y de la fracción de células mononucleares (CMN) se utilizó el siguiente material:

- Una cabina de seguridad biológica, marca TELSTAR, modelo BIO II A.
- Un incubador de CO<sub>2</sub> NUAIRE, modelo NU-4750-E US AutoFlow, con sensor de infrarrojos y camisa de agua de 188 litros. El equipamiento del incubador se complementa con una instalación de CO<sub>2</sub> que asegura el suministro constante de CO<sub>2</sub> a los incubadores, realizando un cambio automático de las botellas.
- Una centrifuga de sobremesa multitarea refrigerada, modelo Allegra X-22R, marca Beckman Coulter, velocidad máxima 15.500 rpm.
- Un rotor basculante, modelo SX4.250, de 4 básculas con adaptadores para tubos de 15 ml y 50 ml.
- Un microscopio invertido de contraste de fase con objetivos 10x, 20x y 40x, modelo CKX41SF2, marca Olympus.
- Histopaque-1077 (Laboratorios Sigma-Aldrich, ref. 10771-500ML), una solución de polisucrosa y diatrizoato sódico, ajustada a una densidad de  $1077 \pm 0.001$ g/ml. Este medio facilita la rápida recogida de células mononucleares viables, de pequeños volúmenes de sangre. McCoy's 5<sup>a</sup>A modificado con L-Glutamina, un medio de cultivo que incorpora aminoácidos. Se emplea este medio para apoyar el crecimiento de cultivos primarios derivados de la médula ósea normal, la piel, las encías, los testículos, riñón de ratón, glándulas suprarrenales, pulmón, bazo, los embriones de rata y otros tejidos.

- Otro material: Placas de Petri, pipetas Pasteur, suero fisiológico, guantes estériles, gradillas, tubos de ensayo y diverso material de cualquier laboratorio de cultivos celulares.

El concentrado leucoplaquetar (CLP) se obtuvo por centrifugación de la sangre periférica. La fracción de células mononucleares (CMN) se obtuvo mediante centrifugación diferencial en gradientes de Ficoll-Hypaque.

### **3. INCUBACIÓN Y CULTIVO DE LOS IMPLANTES CON CLP o CMN**

Previo a su colocación en las conejas, los implantes fueron incubados, en condiciones de esterilidad, durante 30 minutos, con concentrado leucoplaquetar (CLP) o con fracción de células mononucleares (CMN).

Después de la incubación con CLP o CMN, se realizaban tres lavados con suero fisiológico, sembrándose el implante en una placa de Petri de 25 mm. con medio semisólido de McCoy's con citoquinas, siguiendo la metodología de Sutherland et al. 1991, Bernstein et al. 1991 y McNiece et al. 1991.

El crecimiento de las colonias CFU-GM se valoró por cultivo en un medio semisólido de metilcelulosa al 0.9%, sembrando  $5 \times 10^4$  células/ml de medio en placas duplicadas. La composición del medio de cultivo incluye 30% de suero bovino fetal, 1% de albúmina bovina,  $10^{-4}$ M de 2-Mercaptoetanol, 2mM de L-Glutamina, 50ng/ml de Stem Cell Factor, 10 ng/ml de CSF-GM y 10 ng/ml de IL-3 (Stem Cells Technologies Inc. Vancouver, Canadá).

Los cultivos se cuantificaron en un microscopio invertido Olympus después de 14 días de incubación a 37°C de temperatura en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. Los agregados de más de 40 células se consideran colonias, incluyendo como clusters los comprendidos entre 10 y 40 células.

La visualización de estas fracciones celulares en cortes histológicos se realizó con la tinción de May-Grünwald-Giemsa. Para ello se sigue el siguiente

procedimiento:

- 1.- Secado de los cortes.
- 2.- Fijación en solución de May-Grünwald (1 volumen de colorante y 1 volumen de PBS) durante 2 minutos.
- 3.- Inmersión en solución de Giemsa durante 15-20 minutos.
- 4.- Lavado en abundante agua y secado final de los cortes.

## **4. COLOCACIÓN DE LOS IMPLANTES**

### **4.1. Anestesia de los animales**

En el quirófano de Cirugía Experimental, se contaba con un equipo de anestesia (Datex Ohmeda modelo Aestiva/5), conectado a la toma de gases medicinales situada en la pared, con conexiones de:

- Aire Medicinal
- Oxígeno
- Oxido Nitroso
- Vacío para aspiración de secreciones
- Jeringas de 5 ml (BD Discardit II, laboratorios Becton Dickinson)
- Agujas Intramusculares 21 G x 1½ (0.8 x 40 mm. Laboratorios Terumo)

Media hora antes de la intervención se pone una inyección intramuscular de Ketolar (Clorhidrato de Ketamina, 50mg/ml.) presentado en frascos de 10 ml. (Laboratorios Parke-Davis), a una concentración de 0,75 ml/kg. de peso para relajar al animal.

A continuación se le suministra mediante mascarilla, una mezcla de O<sub>2</sub> a 2 litros/ minuto y Forane® (Isoflurano al 100%, envase de 250 ml. Laboratorios Abbott), al 3-3.5%.

Al terminar la intervención se pone 0.5 ml de Buprex 0.3 mg/ml. (Glucosa, Buprenorfina hidrocloreuro, Laboratorios Schering Plough) para controlar el dolor en el postoperatorio inmediato.

#### 4.2. Procedimiento quirúrgico

Un día antes de cada intervención, todas las conejas fueron rasuradas de la zona a operar. Además, se les pesaba al llegar, el día de la intervención y el día del sacrificio.

Para el mismo se utilizó una caja estándar de pequeña cirugía compuesta por:

- 2 tijeras de disección, una curva y otra recta de Mayo y Metzenbaum
- 2 pinzas Axon con y sin dientes.
- 2 Separadores de Farabeuf y Senn-Miller.
- 2 porta-agujas Mayo-Hegar (Hu-Friedy Mfg. Co. Inc).
- Hojas de bisturí del nº 23.
- Equipo completa de lencería estéril tanto para la mesa de quirófano, como para 2 mesas auxiliares donde irán instrumental quirúrgico y micromotor, y para todo el personal que ha de estar estéril durante la intervención. Así como mascarillas, guantes de tamaño adecuado y gasas.

Para la colocación de los implantes se utilizó el siguiente instrumental quirúrgico específico compuesto por:

- Unidad quirúrgica implantológica (Implant Surgical Unit, Friedrichsfeld AG, modelo nº 10 515 00).
- Micromotor Kavo 29 A modelo M 147977.
- Sistema de irrigación de suero fisiológico Kavo/Saniswis ref. 15N112012.
- Brocas de irrigación interna del Sistema Intri: Broca piloto corta de 2 mm. Ref. SPD2 y broca lanceolada, ref. CD4.
- Periostótomos (Bomtempi, Stainless, Alemania).
- Suturas Dexon II trenzadas: Sutura de ácido poliglicólico impregnada en policaprolactona, 4/0(triangular 3/8, 75 cm. Código 744-003), para planos profundos, reabsorbible.
- Sutura de seda 4/0 (Lorca Marin SA, Lorca, Murcia), para la piel.

Los implantes seleccionados para este estudio son implantes de titanio de 8 mm. de longitud por 3.75 de diámetro, Sistema Restore de Lifecore (Lifecore biomedical Inc. 3515 Lyman Blvd. Chaska Mn 55318 USA).

En cada coneja se practica una incisión longitudinal sobre la piel del 1/3 distal del fémur. Se va separando por planos hasta llegar al cótilo externo de la pata derecha.

Realizada la apertura, se practican taladrados secuenciales con brocas de irrigación interna y una velocidad inferior a 1.000 r.p.m. para no sobrecalentar el hueso. Se empieza con una broca-guía de 2 mm. de diámetro, luego con una broca lanceolada que tiene 1.50 mm. en la punta y 3.75 mm. en la base. Se procede entonces a sacar del vial el implante y antes de roscarlo, con una jeringa estéril, como si se realizara un lavado del alveolo sangrante, se introduce el contenido o parte de él en el neo-alveolo. A continuación se rosca el implante hasta que quede a nivel de la cortical, incluyendo el tornillo de cierre hexagonal.

Al lado de éste implante se practicarán los mismos taladrados secuenciales, sólo que solamente introduciremos el contenido del vial sin implante. En la línea inmediatamente superior se vuelve a practicar la misma operación procurando que los implantes estén lo más alejados posible entre sí, ya que se podrían mezclar las diferentes formas de incubación.

Esquemáticamente tendremos la siguiente composición:

- Proximal: Un implante incubado con CLP y un alveolo relleno con CLP
- Distal. Un implante incubado con CMN y un alveolo relleno con CMN.

Una vez realizada la operación se procede a cerrar por planos, los internos con Dexon de 4/0 y la piel con seda de 3/0. Puntos sueltos para los planos profundos y sutura continua para la piel. Se da una dosis de antibioterapia con Kefol 0,075 ml/kg. de peso.

## **5. SACRIFICIO Y NECROPSIA**

El sacrificio de los animales se produjo por inhalación de CO<sub>2</sub> en cámara de eutanasia, según el protocolo que se aplicó a los diferentes grupos estando comprendido entre 7, 14, y 28 días.

Una vez sacrificado el espécimen, en el quirófano se procedió a la extracción del 1/3 distal del fémur de la pata correspondiente. La muestra quirúrgica, debidamente identificada, se guardó en formol tamponado neutro pH 7,4.

## **6. MEDICIÓN DE LA FUERZA DE DESINSERCIÓN (TORQUE) DE LOS IMPLANTES.**

En las conejas seleccionadas, se procedió a la extracción del implante a los 7, 14 y 28 días mediante la llave de carraca dinamométrica del Sistema Semados con capacidad de marcar hasta 30 newtons (Nw). Cuando se superaban los 30 Nw, se abría hasta que alcanzaba un tope rígido a partir del cual se comportaba como una llave fija a expensas de la fuerza del actor, registrándose la fuerza necesaria de acuerdo con los siguientes cuatro intervalos:

- 0-10 Newtons (Nw).
- 11-20 Nw
- 21-30 Nw.
- más de 30 Nw.

## **7. EVALUACIÓN DEL GRADO DE MADURACIÓN ÓSEA**

Realizada esta operación se tomaba una muestra de hueso y se enviaba al laboratorio de anatomía patológica para la posterior evaluación del grado de maduración ósea por parte del anatomopatólogo. Esta maduración ósea se evaluó a nivel del cuello y a nivel de la rosca del implante.

Una vez recibida la muestra ósea, ya sin implante, se fijaba en formalina neutra tamponada, y se cortaba transversalmente el bloque óseo con la zona a estudiar mediante una sierra circular. Se decalcificaba con ácido nítrico al 5% durante 2-3 días y, posteriormente, se incluía en parafina según las técnicas

habituales en el laboratorio:

- a) Deshidratación en grados crecientes de alcoholes.
- b) Aclaramiento en tolueno
- c) Inclusión en parafina.

A continuación se realizaron cortes de  $6\mu$  de espesor mediante micrótomo rotatorio. Estos cortes se tiñeron con tinciones convencionales de hematoxilina-eosina y de tricrómico de Masson.

Las muestras se examinaron con microscopio óptico al que se le incorporaba lente de luz polarizada para la visión de la maduración ósea.

El grado de maduración ósea se evaluó siguiendo un método semi-cuantitativo a criterio del anatomopatólogo en el que se consideraron tres posibilidades:

- Leve (+), grado de maduración ósea entre el 25-50%. Se observa desde tejido conjuntivo ó fibroso a osteoide inmaduro.
- Moderada (++) , grado de maduración ósea entre el 50-75%. Se aprecia existencia de metaplasia ósea discreta-moderada con laminillas óseas.
- Intensa (+++), grado de maduración ósea superior al 75%. Se advierte perfecta osificación, hueso maduro, actividad osteoblástica. Buena osteointegración.

## **8. EVALUACIÓN DEL DESPLAZAMIENTO DEL IMPLANTE DENTRO DEL LECHO ÓSEO TRAS EL SOMETIMIENTO A CARGA.**

Se protocolizaron mediciones en vivo en distintos períodos: en el momento de colocación del implante y a los 7, 14, 21 y 28 días tras la colocación del mismo en las dos patas, con el sistema diseñado al efecto utilizando un bastidor de acero con forma de U, con una célula de carga incorporada y con un amplificador de salida de señal conectado al ordenador.

Para efectuar las mediciones se anestesiaba al animal con ketamina según su peso y anestesia inhalatoria sin intubación, con aplicación de mascarilla con O<sub>2</sub> asociado a Sevoflurano.

En cada momento, se realizaron 5 mediciones. También se administraba una dosis de antibiótico de 1 ml. de Cefazolina 1gr. Una vez anestesiado el animal, se colocaba la pata a medir entre las ramas del bastidor, que estaba provisto de dos brazos terminados en dos piezas cónicas roscadas. ("pinchos"). El izquierdo, merced a un muelle, tenía un recorrido antero-posterior mientras que el derecho estaba fijo (roscado) a la célula de carga. La pata que tenía el implante a medir, estaba siempre posicionada en el lado de la célula de carga. Una vez comprobado que la punta del medidor (pincho) estaba en el interior del hexágono del tornillo de cierre del implante, se posicionaba el medidor izquierdo.

Se calibraba el sistema a 0, y una vez conseguido, se procedía a efectuar la primera medición, que consistía en sujetar la rodilla del conejo contra la célula de carga e ir ejerciendo presión progresivamente. Una vez realizada la medición, se volvía a la posición de reposo por espacio de alrededor de medio minuto. Se volvía a calibrar el sistema y se volvía a efectuar otra medición, así hasta completar las 5 veces. Una vez realizada la medición de una pata se pasaba a la medición de la otra (figuras 3 y 4).

Entre coneja y coneja, se retiraban (desenroscaban) los pinchos y se esterilizaban en una solución de glutaraldehído al 2%.

El equipo necesario incluye lo siguiente:

- CDAQ-9172 chasis USB de alta velocidad con ocho slots para CompactDAQ de NI.
- NI 9237 Módulo puente de 24 bits simultáneos.  $\pm 25\text{mV/V}$  y cuatro canales
- Célula de carga de puente completo Sensy modelo 5.900, con una capacidad de medida de 0 a 200 kN
- Bastidor de acero inoxidable diseñado y fabricado para alojar una célula de carga, en forma de U.
- Software de programación gráfica LabVIEW



**Figura 3.-** Bastidor de acero sobre el que va montada la célula de carga.



**Figura 4.-** Efectuando una medición.

## 9. MÉTODO ESTADÍSTICO

En este trabajo se realizó:

- Una estadística descriptiva (media aritmética, desviación estándar y porcentajes)
- Una estadística analítica. Para la comparación de variables cuantitativas se utilizó el test de student (t-student) para la comparación de dos medias. Para la comparación de variables cualitativas se utilizó el test chi-cuadrado. En tablas 2x2 se utilizó la corrección de Yates, y cuando alguna de las cantidades esperadas fue inferior a 5, se utilizó el test exacto Fisher bilateral.

Se consideró como nivel mínimo de significación un valor de  $p < 0.05$ .

Los datos fueron procesados con el programa estadístico SPSS versión 15.0.1 para Windows (Statistical Package for the Social Sciences; SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

RESULTADOS

## 1. TRATAMIENTO DE LA SUPERFICIE DE LOS IMPLANTES CON CONCENTRADOS

De los 62 implantes colocados, 29 implantes (46,8%) fueron sometidos al método de adhesión superficial con concentrado de células mononucleares (CMN), 14 implantes (22,6%) fueron sometidos al método de adhesión superficial con concentrado de capa leucoplaquetar (CLP), y 19 implantes (30,6%) sin ningún tipo de tratamiento superficial o de control (tabla 1).

**Tabla 1.-** Tratamientos superficiales de los implantes según los concentrados.

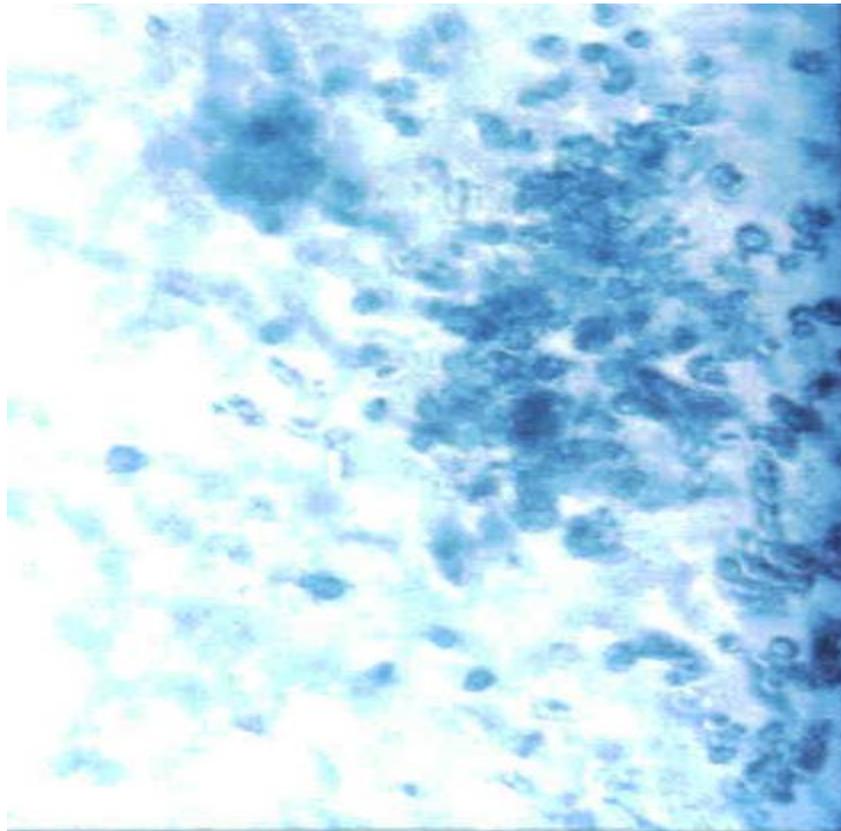
	nº casos	Porcentaje
CMN	29	46,8%
CLP	14	22,6%
Sin concentrado	19	30,6%
Total	62	100%

**CMN:** células mononucleares; **CLP:** capa leucoplaquetar.

Las siguientes microfotografías muestran la adhesión de las células mononucleares (CMN) tanto a la rosca (figura 5) como al cuello del implante (figura 6).



**Figura 5.** Adhesión de células mononucleares (CMN) a la rosca del Implante. Tinción de May-Grünwald-Giemsa.



**Figura 6.** Adhesión de células mononucleares (CMN) al cuello del Implante. Tinción de May-Grünwald-Giemsa.

## 2. MEDICION DE LA FUERZA DE DESINSERCIÓN (TORQUE)

La tabla 2 recoge la fuerza en Newtons (Nw) necesaria para desinsertar los implantes del lecho óseo. 12 implante (el 35,3%) requieren una fuerza de desinserción de entre 11 y 20 Nw. 10 implantes (el 29,4%) necesitan un torque de desinserción de entre 21 y 30 Nw. El 20,6% (7 implantes) con un torque de más de 30 Newtons y en último lugar, con un 14,7% (5 implantes), un torque de desinserción de entre 0 a 10 Newtons.

**Tabla 2.- Fuerza de torque necesaria para la desinserción del implante.**

Fuerza	nº casos	Porcentaje
0-10 Nw	5	14,7%
11-20 Nw	12	35,3%
21-30 Nw	10	29,4%
>30 Nw	7	20,6%
Total	34	100%

**Nw:** Newtons

Cuando se compara la fuerza necesaria para desinsertar los implantes atendiendo a su recubrimiento superficial (tabla 3): un grupo de implantes tratados con un concentrado de capa leucoplaquetar (CLP); otro tratado con un concentrado de células mononucleares (CMN) y otro de control, esto es sin ningún tipo de recubrimiento superficial celular se observa: en el rango de 0 a 10 Newtons: un 40% de implantes correspondientes al grupo de control, un 21,4% correspondientes al grupo recubierto con un concentrado de CLP y ninguno (0%) correspondiente al grupo recubierto con un concentrado de CMN.

En el rango entre 11 y 20 Newtons: un 64,3% correspondiente al grupo recubierto con un concentrado de CLP; un 40% correspondiente al grupo de control y un 6,6% correspondiente al grupo recubierto con un concentrado de CMN.

En el rango entre 21 y 30 Newtons: el 46,7% correspondiente al grupo recubierto con un concentrado de CMN; el 20% correspondientes al grupo recubierto con un concentrado de CLP y el 20% correspondiente al grupo de control. Finalmente, en el rango de más de 30 Newtons hay un 46,7% correspondiente al grupo recubierto con un concentrado de CMN. El grupo recubierto con un concentrado de CLP y el grupo de control no tienen ningún implante (0%) en este rango. Tras el análisis estadístico se encontraron diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre ambos parámetros.

**Tabla 3.-** Fuerza de desinserción según los concentrados aplicados en la superficie del implante.

Grupo	Fuerza				Total
	0-10 Nw n (%)	11-20 Nw n (%)	21-30 Nw n (%)	>30 Nw n (%)	
CLP	3 (21,4%)	9 (64,3%)	2 (14,3%)	0 (0%)	14 (100%)
CMN	0 (0%)	1 (6,6%)	7 (46,7%)	7 (46,7%)	15 (100%)
Sin concentrado	2 (40,0%)	2 (40,0%)	1 (20%)	0 (0%)	5 (100%)
Total	5 (14,7%)	12 (35,3%)	10 (29,4%)	7 (20,6%)	34 (100%)

**Nw:** Newtons; **CMN:** células mononucleares; **CLP** : capa leucoplaquetar.

$\chi^2=23,28$   $p < 0,001$

En la tabla 4 se recoge la relación del peso medio, medido en gramos de las conejas según sean tratados los implantes con algún tipo de concentrado ó sin él.

Así se aprecia una media menor para el grupo sin ningún tipo de concentrados ( $3564,33 \pm 180,639$  gramos), que para los implantes tratados con concentrados ( $3575,85 \pm 195,143$  gramos). No obstante, no se halló relación estadísticamente significativa ( $p=0,867$ ) entre las variables.

**Tabla 4.-** Relación entre el peso medio de los animales de experimentación y el tratamiento de superficie aplicado a los implantes.

<b>Grupo</b>	<b>Media <math>\pm</math> Desviación estándar</b>
Sin concentrado	$3564,33 \pm 180,639$ gramos
CMN o CLP	$3575,85 \pm 195,143$ gramos

**CMN:** células mononucleares; **CLP:** capa leucoplaquetar.  $p=0,867$

La tabla 5 muestra la comparación entre el peso medio (gramos) de los animales de experimentación en función de los intervalos de fuerza necesarios para desinsertar los implantes. Así observamos que el menor peso ( $3350 \pm 0,00$  gramos) correspondería al rango de fuerza comprendido entre 21 y 30 Newtons. El siguiente rango de menor peso ( $3480,00 \pm 106,771$  gramos) correspondería al rango de fuerza comprendido entre 0 y 10 Newtons, y el rango de mayor peso ( $3576,70 \pm 175,787$  gramos) correspondería al rango de fuerza comprendido entre los 11 y 20 Newtons. Sin embargo, no se observó asociación estadísticamente significativa ( $p=0,296$ ).

**Tabla 5.-** Relación entre el peso medio de los animales de experimentación y la fuerza de desinserción.

<b>Fuerza</b>	<b>Media <math>\pm</math> Desviación estándar</b>
0-10 Nw	$3480,00 \pm 106,771$ gramos
11-20 Nw	$3576,70 \pm 175,787$ gramos
21-30 Nw	$3350,00 \pm 0,00$ gramos

**Nw:** Newtons.

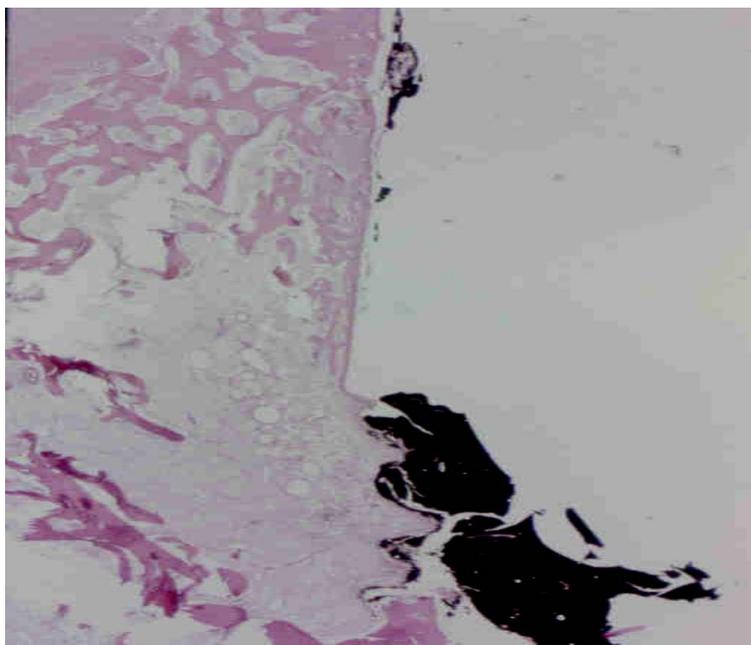
$p=0,296$

### 3. MADURACIÓN ÓSEA A NIVEL DEL CUELLO Y A NIVEL DE LA ROSCA DEL IMPLANTE

Atendiendo a los distintos valores de maduración ósea a nivel del cuello (tabla 6 y figura 7), se observan 5 casos (14,7%) con maduración ósea leve, 10 casos (29,4%) con maduración ósea moderada y 19 casos (55,9%) con maduración ósea intensa.

**Tabla 6.-** Maduración ósea a nivel del cuello del implante.

Maduración ósea	nº casos	Porcentaje
Leve (+)	5	14,7%
Moderada (++)	10	29,4%
Intensa (+++)	19	55,9%
Total	34	100%



**Figura 7.-** Maduración ósea intensa (+++) a nivel del cuello. Tinción: Hematoxilina-eosina.

En la tabla 7 y en la figura 8 se presenta el grado de maduración ósea a nivel de la rosca del implante, se encuentran 6 casos (17,6%) con maduración ósea leve, 14 casos (41,2%) con maduración ósea moderada y otros 14 casos (41,2%) con maduración ósea intensa.

**Tabla 7.-** Maduración ósea a nivel de la rosca del implante.

Maduración ósea	nº casos	Porcentaje
Leve (+)	6	17,6%
Moderada (++)	14	41,2%
Intensa (+++)	14	41,2%
Total	34	100%

**Figura 8.-** Maduración ósea intensa (+++) a nivel de la rosca del implante. Tinción: Hematoxilina-eosina.

Al relacionar los resultados obtenidos entre la maduración ósea del cuello de los implantes y los obtenidos en la rosca de los mismos (tabla 8), los resultados son los siguientes: en la maduración leve (+), de un total de 11 casos (14,7%), 5 implantes corresponderían al cuello (14,1%) y 6 implantes corresponderían a la rosca del mismo (17,9%). En la maduración moderada (++) , de un total de 24 casos (29,4%), 10 implantes (29,4%) corresponderían al cuello y 14 (41,1%)

corresponderían a la rosca. Por último, en el grupo con maduración ósea intensa (+++), de un total de 33 casos (55,9%), 19 implantes corresponderían al cuello y 14 implantes corresponderían a la rosca. Tras el análisis estadístico, no existe relación significativa ( $p=0,46$ ) entre estos parámetros.

**Tabla 8.-** Comparación entre el grado de maduración ósea a nivel del cuello y de la rosca de los implantes.

Maduración ósea	Localización		Total n (%)
	Cuello n (%)	Rosca n (%)	
Leve (+)	5 (14,1%)	6 (17,9%)	11 (14,7%)
Moderada (++)	10 (29,4%)	14 (41,1%)	24 (29,4%)
Intensa (+++)	19 (55,8%)	14 (41,1%)	33 (55,9%)
Total	34 (100%)	34 (100%)	68 (100%)

$$\chi^2 = 1,51 \quad p = 0,46$$

En la tabla 9 se exhibe la comparación entre el grado de maduración ósea en el cuello del implante de acuerdo al tratamiento superficial administrado a los implantes. En el grupo de maduración ósea leve (+): 2 implantes sin concentrados (grupo control); 4 implantes tratados con CLP y ninguno tratado con CMN. En el grupo de maduración ósea moderada (++): 1 implante sin tratamiento (control), 2 implantes tratados con CLP y 3 implantes tratados con CMN. Por último, en el grupo de maduración ósea intensa (+++): 2 implantes sin tratamiento de superficie, 4 implantes tratados con CLP y 9 implantes tratados con CMN. No obstante, no existen diferencias estadísticamente significativas al comparar ambas variables ( $p=0,17$ ).

**Tabla 9.-** Comparación entre el grado de maduración ósea a nivel del cuello atendiendo al tipo de concentrado utilizado para tratar la superficie del implante.

Maduración ósea	Grupo		
	Sin concentrado n (%)	CLP n (%)	CMN n (%)
Leve (+)	2 (40%)	4 (40%)	0 (0%)
Moderada (++)	1 (20%)	2 (20%)	3 (25%)
Intensa (+++)	2 (40%)	4 (40%)	9 (75%)
Total	5 (100%)	10 (100%)	12 (100%)

**CLP:** capa leucoplaquetar; **CMN:** células mononucleares.

$$\chi^2 = 6,34 \quad p = 0,17$$

Cuando se compara el grado de maduración ósea a nivel de la rosca del implante considerando el tratamiento superficial administrado a los mismos (tabla 10) se comprueba que en el grupo con maduración ósea leve (+) hay: 2 casos sin ningún tipo de tratamiento (grupo control), 4 casos con tratamiento con CLP y ningún caso con tratamiento de CMN.

Con maduración ósea moderada (++), 1 caso sin tratamiento superficial, 7 casos en el grupo de CLP y 5 casos en el grupo CMN. Finalmente, en el grupo de implantes con maduración intensa (+++) a nivel de la rosca se ubican 2 implantes sin tratamiento, otros 2 en el grupo tratado con CLP y 9 implantes tratados con CMN. El análisis estadístico fue significativo ( $p=0,04$ ).

**Tabla 10.-** Comparación entre el grado de maduración ósea a nivel de la rosca en función del tipo de concentrado utilizado para tratar la superficie del implante.

Maduración ósea	Grupo		
	Sin concentrado n (%)	CLP n (%)	CMN n (%)
Leve (+)	2 (40%)	4 (30,8%)	0 (0%)
Moderada (++)	1 (20%)	7 (53,8%)	5 (35,7%)
Intensa (+++)	2 (40%)	2 (15,4%)	9 (64,3%)
Total	5 (100%)	13 (100%)	14 (100%)

**CLP:** capa leucoplaquetar; **CMN:** células mononucleares.

$\chi^2=9,96$   $p=0,04$

#### 4. DESPLAZAMIENTOS MEDIOS (RIGIDEZ) MEDIDOS EN 5 MOMENTOS DIFERENTES DE COLOCACIÓN DEL IMPLANTE: INICIAL, 7 DÍAS, 14 DÍAS, 21 DÍAS Y 28 DÍAS

##### 4.1. Momento de colocación del implante

La tabla 11 recoge los valores medios del desplazamiento medio del implante dentro del hueso cuando el tornillo de cierre es sometido a una fuerza de carga. En este momento inicial, para cada uno de los implantes, se realizaron 5 mediciones de la presión intraósea media [expresados en Newtons/milímetro (Nw/mm)].

**Tabla 11.-** Valores medios de presión intraósea en el momento inicial de colocación del implante.

Mediciones	n	Media $\pm$ D.E.	Rango
1ª medición	24	3,30882 $\pm$ 2,032006 Nw/mm	0,230-9859 Nw/mm
2ª medición	24	3,11593 $\pm$ 1,949904 Nw/mm	1,209-10,078 Nw/mm
3ª medición	23	3,03324 $\pm$ 1,996074 Nw/mm	0,30-9,754 Nw/mm
4ª medición	23	3,05961 $\pm$ 1,934279 Nw/mm	0,470-9,793 Nw/mm
5ª medición	23	2,93059 $\pm$ 1,950883 Nw/mm	0,159-9,824 Nw/mm

**Nw/mm:** Newtons/milímetro; **D.E.:** Desviación estándar.

##### 4.2. A los 7 días de la colocación del implante

Los valores medios del desplazamiento tras el sometimiento del tornillo del implante a fuerza de carga a los 7 días de la colocación del mismo se indican en la tabla 12.

**Tabla 12.-** Valores medios de presión intraósea a los 7 días de la colocación del implante.

Mediciones	n	Media $\pm$ D.E.	Rango
1ª medición	28	1,91081 $\pm$ 1,097223 Nw/mm	0,500-5,275 Nw/mm
2ª medición	28	2,01733 $\pm$ 1,157561 Nw/mm	0,691-3,994 Nw/mm
3ª medición	28	1,91582 $\pm$ 0,809203 Nw/mm	0,691-3,994 Nw/mm
4ª medición	28	1,86644 $\pm$ 0,596110 Nw/mm	0,792-2,965 Nw/mm
5ª medición	27	2,14841 $\pm$ 1,265757 Nw/mm	0,031-5,412 Nw/mm

**Nw/mm:** Newtons/milímetro; **D.E.:** Desviación estándar.

### 4.3. A los 14 días de la colocación del implante

La tabla 13 muestra los valores medios del desplazamiento del implante dentro del hueso cuando el tornillo de cierre es sometido a una fuerza de carga. A los 14 días de la colocación del implante, para cada uno de ellos implantes, se realizaron 5 mediciones.

**Tabla 13.-** Valores medios de presión intraósea a los 14 días de la colocación del implante.

Mediciones	n	Media ± D.E.	Rango
1ª medición	12	1,78789 ±1,441849 Nw/mm	0,650-5,966 Nw/mm
2ª medición	9	1,66396 ±0,799332 Nw/mm	0,931-3,064 Nw/mm
3ª medición	8	1,53823 ±0,542481 Nw/mm	0,924-2,499 Nw/mm
4ª medición	8	1,98271 ±0,849305 Nw/mm	1,237-3,268 Nw/mm
5ª medición	8	1,77752 ±1,322711 Nw/mm	0,642-4,605 Nw/mm

**Nw/mm:** Newtons/milímetro; **D.E.:** Desviación estándar.

### 4.4. A los 21 días de la colocación del implante

Los valores medios del desplazamiento tras el sometimiento del tornillo del implante a fuerza de carga a los 21 días de la colocación del mismo se representan en la tabla 14.

**Tabla 14.-** Valores medios de presión intraósea a los 21 días de la colocación del implante.

Mediciones	n	Media ± D.E.	Rango
1ª medición	11	1,74977 ±1,353551 Nw/mm	0,446-5,491 Nw/mm
2ª medición	11	1,51911 ±0,628846 Nw/mm	0,534-2,613 Nw/mm
3ª medición	8	1,51460 ±0,336889 Nw/mm	1,008-1,957 Nw/mm
4ª medición	7	1,67134 ±0,494380 Nw/mm	1,125-2,629 Nw/mm
5ª medición	7	1,41873 ±0,634523 Nw/mm	0,101-1,955 Nw/mm

**Nw/mm:** Newtons/milímetro; **D.E.:** Desviación estándar.

### 4.5. A los 28 días de la colocación del implante

La tabla 15 describe los valores medios del desplazamiento del implante dentro del hueso tras el sometimiento a carga a los 28 días de su colocación.

**Tabla 15.-** Valores medios de presión intraósea a los 28 días de la colocación del implante.

Mediciones	n	Media ± D.E.	Rango
1ª medición	16	3,35578 ±3,564960 Nw/mm	0,110-11,647 Nw/mm
2ª medición	15	2,75799 ±2,70130 Nw/mm	0,60-8,972 Nw/mm
3ª medición	13	3,36009 ±2,782045 Nw/mm	1,202-9,525 Nw/mm
4ª medición	13	2,97132 ±2,312373 Nw/mm	0,000-8,162 Nw/mm
5ª medición	10	2,23463 ±1,843975 Nw/mm	0,334-7,233 Nw/mm

**Nw/mm:** Newtons/milímetro; **D.E.:** Desviación estándar.

## 5. DESPLAZAMIENTOS MEDIOS (RIGIDEZ) SEGÚN LOS CONCENTRADOS

En la tabla 16 se muestra la comparación entre el desplazamiento medio del implante tras el sometimiento a carga en cada período de tiempo (0 días, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días) en función del tratamiento de superficie aplicado a los implantes: sin tratamiento (control) o con concentrado de células mononucleares (CMN).

**Tabla 16.-** Comparación entre la presión media intraósea en los distintos períodos de tiempo atendiendo al tipo de tratamiento de superficie aplicado a los implantes.

	Momento colocación implante	A los 7 días	A los 14 días	A los 21 días	A los 28 días
Grupo	Media±D.E.	Media±D.E.	Media±D.E.	Media±D.E.	Media±D.E.
CMN	1,9184±0,52156 Nw/mm	1,5327±0,36822 Nw/mm	1,4219±0,67806 Nw/mm	1,4300±0,10481 Nw/mm	1,6498±0,45286 Nw/mm
Control	4,1826±1,86624 Nw/mm	2,5045±0,72955 Nw/mm	2,1546±0,49437 Nw/mm	1,7775±0,51180 Nw/mm	3,4278±2,85597 Nw/mm
Sig.	p=0,001	p<0,001	p=0,158	p=0,309	p=0,206

**CMN:** Concentrado de células mononucleares; **Control:** sin tratamiento superficial; **Nw/mm:** Newtons/milímetro; **D.E.:** Desviación estándar; **Sig.:** Significación.

En el momento de colocación del implante, los implantes tratados con CMN tenían un desplazamiento medio dentro del hueso de 1,9184±0,52156 Nw/mm, mucho menor que el desplazamiento de los implantes no tratados superficialmente (4,1826±1,86624 Nw/mm), encontrándose diferencias muy significativas (p=0,001).

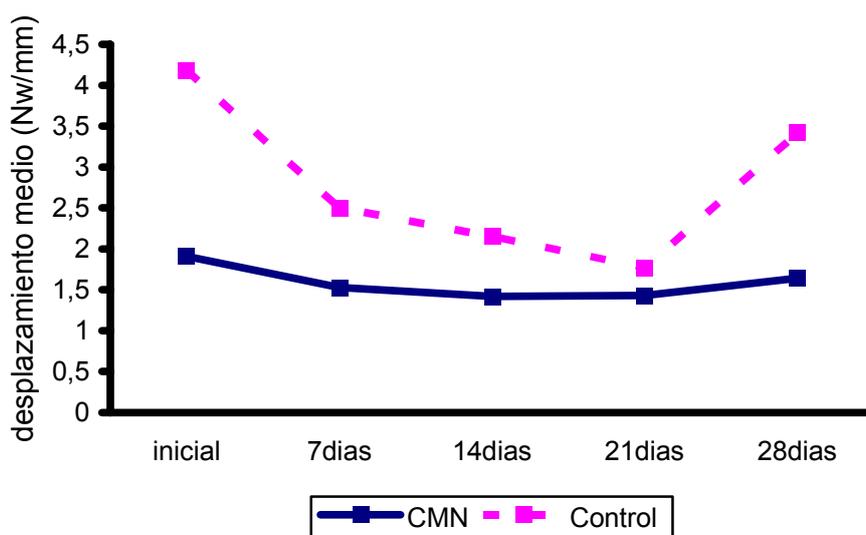
A los 7 días de la colocación del implante, en el grupo tratado con CMN, el desplazamiento medio es de 1,5327±0,36822 Nw/mm, mientras que en el grupo control es superior con un valor de 2,5045±0,72955 Nw/mm, existiendo relación estadística altamente significativa (p<0,001).

A los 14 días de la colocación del implante, disminuye la diferencia entre los dos valores medios:  $1,4219 \pm 0,67806$  Nw/mm en el grupo tratado con CMN y  $2,1546 \pm 0,49437$  Nw/mm en los implantes sin tratamiento, sin asociación estadísticamente significativa ( $p=0,158$ ).

A los 21 días de la colocación del implante, los valores se acercan mucho entre sí:  $1,4300 \pm 0,10481$  Nw/mm (grupo CMN) y  $1,7775 \pm 0,51180$  Nw/mm (grupo control). No obstante, tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,309$ ).

Finalmente, a los 28 días de la colocación del implante, vuelve a aumentar la diferencia entre las dos medidas medias. En los implante tratados con CMN es  $1,6498 \pm 0,45286$  Nw/mm y en el grupo control es  $3,4278 \pm 2,85597$  Nw/mm. Como en casos anteriores, tras el análisis estadístico no se observó relación significativa ( $p=0,206$ ).

La figura 3 muestra un gráfico de líneas con la evolución del desplazamiento medio intraóseo de los implantes tratados con CMN y sin ningún tipo de tratamiento superficial en los distintos períodos de tiempo considerados: inicial (momento de colocación del implante), 7 días, 14 días, 21 días y 28 días tras la colocación del mismo.



**Figura 3.** Evolución del desplazamiento medio intraóseo de los implantes con tratamiento con CMN y sin tratamiento de superficie (grupo control) en los distintos períodos de tiempo.

DISCUSIÓN

Desde la aparición de los trabajos realizados por el profesor Brånemark (1977, 1983, 1985), los implantes intraóseos con forma de raíz han dominado la práctica clínica de forma creciente. Analizando los datos aportados por Markets and Markets (Millenium Research Group, 2010) podemos situar el grado de relevancia de la Implantología en el contexto de la investigación de las Ciencias de la Salud y de la industria. Estos datos muestran que desde el punto de vista económico, en el año 2010 el crecimiento de la cifra de ventas será de 3,2 billones de dólares en los EEUU y de 4,2 billones en el 2015. Europa es en la actualidad el mayor mercado mundial de implantes dentales con un 42% de cuota de mercado. Desde el advenimiento de la anestesia local probablemente no había existido otro fenómeno con tanto impacto en el campo de la salud dental.

La investigación es cada vez más intensa en todos los aspectos que pueden influir para mejorar los resultados: en el material, en la técnica quirúrgica y en la prostodoncia. La morfología externa del implante, la influencia de la microsuperficie en la respuesta biológica, las técnicas de aumento óseo, los diseños de los componentes protésicos que aumentan la precisión en su ensamblaje al implante, la estética o la simplicidad de los elementos que componen la unidad implante-prótesis están continuamente mejorando y renovándose.

El crecimiento explosivo de la información científica, divulgativa o la facilitada por la industria dificulta las conclusiones que pueden extraer los profesionales, puesto que no siempre los trabajos publicados tienen un control de calidad adecuado. Se precisan evidencias científicas rigurosas que avalen de forma suficiente las nuevas aportaciones, para que éstas sean incorporadas sin reservas a los planes de tratamiento de los pacientes que acuden en busca de soluciones a sus problemas de edentulismo (Sánchez-Garcés, 2005).

La investigación en animales es esencial antes de decidir cualquier aplicación en los seres humanos de una nueva posibilidad diagnóstica o terapéutica. De todas formas se debe ser cauteloso en la interpretación de los resultados debido a las limitaciones que puedan tener estos estudios. Las

respuestas obtenidas en condiciones estándar en animales pueden no ser totalmente extrapolables a la misma experiencia realizada en humanos, ya que existen diferencias entre especies respecto a la respuesta a una terapia (Selvig, 1994).

La variabilidad biológica existe además entre individuos de la misma especie debido a las características genéticas, bioquímicas, fisiológicas o a factores inmunológicos propios de cada animal. Otros elementos que influyen en los resultados son los factores que pueden ser controlados, y que deben serlo de una forma rígida si se quiere estandarizar una respuesta, como son: los cuidados a los que debe someterse el animal pre y postoperatoriamente, el control de la infección de una herida y la propia técnica diagnóstica o quirúrgica a la que es sometido. En nuestro caso la elección del conejo como modelo animal viene avalada por múltiples estudios publicados previamente utilizando el mismo modelo a los que se colocan implantes en las mismas situaciones anatómicas (Sennerby et al., 1992; Gottlander et al., 1992; Meredith et al., 1997; Klokkevold et al., 1997; Sennerby y Miyamoto, 2000; Gottlow et al., 2000; London et al., 2002; Maeztu et al., 2003; Jang et al., 2010), aunque no todos utilizan medidas estandarizadas de implantes, tal y como se encuentran comercializados y utilizan diámetros o longitudes inferiores a las disponibles habitualmente y que son implantes diseñados especialmente para la ocasión.

Otro de los factores que no cumplen todos los estudios es, debido al factor “longitud del implante”, el hecho de que los implantes se encuentren bicorticalizados, lo que significa que los dos extremos apical y coronal contactan con las corticales de la diáfisis ósea tanto a nivel femoral como tibial. Este es un factor importante a tener en cuenta en la valoración y comparación de los resultados obtenidos y que no está reflejado en todos los artículos (Klokkevold et al., 1997; Meredith et al., 1997; Sul et al., 2002), y en nuestra opinión merece destacarse su interés, puesto que la medular ósea del conejo está muy pobremente trabeculizada, y la osteointegración del implante en la porción que se encuentra en esa zona esponjosa se consigue gracias a la osteoconducción desde las corticales.

Cuando el implante está bicorticalizado la fuente de osteointegración será mayor, y no será gracias a la calidad de la superficie exclusivamente, sino también por la doble fuente celular procedente de las corticales, que aprovecha la capacidad de osteoconducción de la superficie implantaria por ambos extremos del implante. Además la bicorticalización implica un incremento o como mínimo una mayor seguridad en la estabilidad primaria, ya que es un factor determinante para conseguir una osteointegración de forma más segura y más rápida.

Diferentes autores emplearon longitudes y diámetros iguales (Meredith et al., 1997; Sennerby et al., 2000) y otros inferiores (Klokkevold et al., 1997; Gottlow et al., 2000; London et al., 2002). Solo Sennerby et al., 2000 utilizaron implantes de 11 mm de longitud por 4 mm de diámetro debido a que, en su estudio comparativo, emplearon dos tipos de implantes pertenecientes a diferentes diseños comercializados, siendo una de ellos (fijaciones ITI Straumann, Waldenburg, Alemania) de la medida estandarizada por el fabricante (11 mm x 4 mm).

Incluso London et al. 2002, Sennerby et al., 1992 o Klokkevold et al. 1997, utilizaron en algunos de sus trabajos implantes de 4 mm. de longitud para analizar la respuesta de una superficie según el tipo de hueso, o bien establecer comparaciones entre varias superficies implantarias. En estos casos, lo que se valoró fue el comportamiento de la superficie integrada en hueso totalmente cortical, despreciando el hueso medular de baja calidad, que en nuestra opinión es el que realmente establece las diferencias más demostrativas entre implantes en cuanto a la facilidad de su osteointegración, especialmente en el conejo, ya que como hemos comentado anteriormente la calidad del hueso medular es extremadamente baja.

Considerando esta situación, Sennerby et al., 1992, colocaron los implantes de 4 mm de longitud en el hueso esponjoso de la epífisis del fémur de conejo para comprobar la influencia en la osteointegración de una superficie implantaria mejorada al aumentar la capa de TiO<sub>2</sub>, precedente del futuro implante TiUnite®.

En este estudio además se pretendía establecer si existía alguna relación entre los resultados histológicos y el torque de extracción de los implantes situados en dicha localización y los situados en la tibia del mismo conejo donde existía más hueso de tipo cortical. Cabe destacar de este estudio (Sennerby et al., 1992) que, en los cortes histológicos efectuados a las 6 semanas, el mayor índice de contacto óseo de las roscas lo mostraban los implantes situados en hueso esponjoso a pesar de que el torque de remoción fuera inferior respecto a los situados en hueso cortical a igualdad de tiempo, por tanto la conclusión del trabajo es clarificadora, la resistencia a la extracción de un implante es lo que traduce su grado de osteointegración, y depende de la cantidad de hueso “compacto” que le rodea, y no del porcentaje de contacto óseo-implante (interface) en cifras absolutas. Además se evidenció que el porcentaje de contacto óseo era mayor para los implantes de superficie TiUnite® incluso con el hueso de peor calidad lo que contrasta con nuestros resultados.

La utilización del torque de desinserción como sistema de remoción de los implantes constituye otro elemento más en nuestro estudio, que nos aporta valores sobre el porcentaje de contacto hueso-implante.

Uno de los mayores inconvenientes que se pueden encontrar en la literatura científica sobre estos tests es que su realización y los valores apuntados no resultan muy homogéneos dada la diferencia entre los animales empleados en cada experimentación.

Klokkevold et al., 1997, estudiaron el comportamiento biomecánico, a las 8 semanas en fémur de conejos, de implantes con superficie con grabado ácido (HCl/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) -superficie Osseotite- en comparación con superficies lisas. Obtuvo valores cuatro veces superiores para las superficies grabadas: 20,30 Ncm frente a los 4,85 Ncm para las superficies lisas.

Cordioli et al. 2000, compararon entre otras, las superficies obtenidas mediante arenado con óxido de titanio (Tioblast) con las superficies grabadas con ácido (Osseotite) en un estudio realizado sobre tibias de conejo, colocando

12 implantes de cada una de las superficies y valorando los resultados a las 5 semanas. Los valores obtenidos son significativamente superiores para las superficies grabadas con ácido –Osseotite, 40,85 Ncm-, frente al arenado con TiO<sub>2</sub> – 26,85 Ncm-. El estudio histomorfométrico paralelo a los valores de torque mostró, de igual forma, una correlación positiva entre ambos análisis.

Gottlow et al. 2000, estudiaron en tibias de conejo, la superficie TiUnite® con superficies grabadas con ácido, tipo Osseotite y encontraron que a las 6 semanas, había valores superiores de torque de desinsercción para la superficie TiUnite® -35 Ncm frente a 25 Ncm.

Jang et al. 2010 estudiaron también tibias de conejos, a las que previamente les habían provocado un defecto de 7 mm. mediante una trefina e insertando implantes de 3x10 mm. La respuesta en esos defectos peri-implantarios de un injerto de polvo de seda y PRF Choukroun. Tras el sacrificio a las 8 semanas, obtuvieron un torque en el grupo control de 21,86 Ncm y de 30,34 en grupo experimental.

Al hacer una comparación entre estos trabajos y el nuestro, es preciso insistir en que nuestros implantes eran mecanizados sin ningún tipo de recubrimiento, pasivado, chorreado o grabado ácido y que solamente tenían el recubrimiento biológico: CLP o CMN consistentes en UFC-GM, que eran las que se obtenían después de realizar la manipulación de la sangre periférica.

Comparando estos resultados con el trabajo de Klokkevold et al., 1997, siendo las mismas localizaciones anatómicas, fémur de conejo y a un tiempo mucho más elevado, 8 semanas, nuestra situación es mucho más favorable. Resultados similares a los nuestros, los encontramos en el trabajo de Jang et al., 2010, aunque debemos destacar que el tiempo de sacrificio, 8 semanas era el doble que el nuestro. Las situaciones anatómicas de los trabajos de Cordioli et al., 2000, Gottlow et al., 2000 y de Jang et al., 2010, fueron diferentes, ya que ellos utilizaron las tibias, que como apuntamos anteriormente existe mas hueso de tipo cortical, podemos ver que también mejoramos las expectativas planteadas.

Solo existían dos parámetros a estudiar: el implante control o lo que es lo mismo el implante mecanizado sin ningún tipo de tratamiento superficial y “seco” y el implante incubado con CMNs obtenidas de sangre periférica en la sala del quirófano. Es difícil realizar este tipo de experiencia por todo lo que conlleva: anestesia de cada sesión, riesgo de infección alto, repetición de las muestras manteniendo fijos todos los parámetros, calibración de los sensores después de cada medición, etc.

Los diámetros utilizados en diferentes estudios (Sennerby et al., 1992; Klokkevold et al., 1997; Meredith et al., 1997; Maeztu et al., 1999; Sennerby et al., 2000; Gottlow et al., 2000; London et al., 2002) oscilan entre 4,1 mm y 3 mm. A diferencia del factor longitud, este aspecto probablemente no tiene relevancia respecto a los resultados histológicos, y podría tenerlo cuando se pretende evaluar la estabilidad primaria, el torque de extracción o la capacidad de soportar una carga funcional. En nuestro trabajo se prefirió utilizar el diámetro más pequeño de los empleados en el tratamiento de los casos clínicos en humanos, sin construir un modelo de implante diseñado expresamente para el estudio que se adaptase fácilmente a las dimensiones óseas de las extremidades del conejo, facilitando de esta forma que casi la totalidad del implante quedase incluido en hueso cortical, dado que esta situación podría sesgar el resultado que no sería tan extrapolable a las condiciones humanas más usuales. El tamaño de la muestra en nuestro estudio ha sido de 31 animales.

En otros estudios revisados el número de animales estudiados fue muy variable: 2 (Jang et al., 2010); 8 (Gottlow et al., 2000; Albrektsson et al., 2000); 10 ejemplares (Klokkevold et al., 1997; Meredith et al., 1997; Sennerby et al., 2000, Sul et al., 2002); 11 (London et al., 2002); 22 (Maeztu et al., 2003) y 23 animales (Sennerby et al., 1992).

Sennerby et al., 1992, utilizaron 25 ejemplares que fueron sacrificados escalonadamente en grupos de 6 a las 3 semanas, 3 meses, 6 meses y un último grupo de 5 animales a los 12 meses. También fueron sacrificados de forma escalonada los que corresponden al estudio de Maeztu et al., 2003.

De todos modos al final del experimento, ninguno de los trabajos anteriormente mencionados consiguió un número de animales superior a nuestro trabajo.

Con respecto a los tiempos de seguimiento, éstos también oscilan mucho entre unos trabajos y otros. Algunos lo sitúan en 14 días (6 implantes) (Meredith et al., 1997) y otros lo extienden hasta 12 meses (Sennerby et al., 1992).

Maeztu et al., 2003 sacrificaron los animales a los 3 meses; London et al., 2002 los sacrifica en intervalos de 1 semana hasta las 8 semanas; Jang et al., 2010, los sacrifica a las 8 semanas y la mayoría de ellos finalizan el trabajo a las 6 semanas (Klokkevold et al., 1997; Sul et al., 2002). Sennerby et al., 1993, demuestran que después de insertar un implante de titanio en el conejo, existe una aposición de hueso inmaduro que se va remodelando sobre su superficie hasta convertirse en hueso maduro en un periodo de 42 días (6 semanas), y que entre los 90 y 180 días no existe apenas remodelado óseo.

En este trabajo también se realizó un estudio radiográfico, ya que sistemáticamente fueron tomadas radiografías de todos y cada uno de los implantes colocados. En un primer momento se utilizó la radiografía para estandarizar el protocolo de colocación de los implantes. Una vez conseguido esto las radiografías solo tuvieron un valor testimonial ya que se obtenían postnecropsia. No obstante, sirven de testigos de cómo están colocados los implantes y del hueso que los rodea.

El principal motivo de este trabajo era desarrollar un protocolo de fácil aplicación en clínica que mejorara en la medida que fuese la adhesión de los implantes, cualquier sistema de implantes y la reducción del post-operatorio. Si además se lograba demostrar que con estas técnicas se conseguía una buena estabilidad primaria, se dejaba la puerta abierta a la carga inmediata.

Se obtuvo capa leucoplaquetar en la que estaban presentes tanto el plasma rico en plaquetas como el plasma pobre en plaquetas, eso sí

debidamente identificados. El plasma pobre estaba en la capa superior de la probeta mientras que el plasma rico estaba en el centro. Abajo, y debido a su mayor densidad estaba la serie roja. Incluso, pensando que en la mayoría de las clínicas dentales no poseen ni siquiera una centrifuga, y habida cuenta que no solo se pensaba en la mejora de la adhesión de los implantes, sino en la práctica diaria, se podía utilizar para exodoncias, periodoncia etc. con la única premisa de una simple extracción sanguínea, se pensó en conseguir la capa leucoplaquetar por simple decantación, esto es después de realizada la extracción sanguínea se dejaba reposar el vial en posición vertical hasta que por el paso del tiempo se realizaba la separación celular. Para ello diseñamos un protocolo que incluía tanto la separación mediante centrifugado como por decantación. Así realizamos un estudio in Vitro, cultivando implantes dentales tanto con la capa leucoplaquetar como con células mononucleares (Arruga et al., 2001). En dicho estudio se observó que se producía adhesión tanto al cuello como a la rosca de los implantes con dicha capa leucoplaquetar.

Otro trabajo en esa línea de investigación, permitió la obtención de un gel de la capa leucoplaquetar mediante la adición de ClCa e incluso una pequeña cantidad de la serie roja (Arruga, 2002).

Así Pierce, 1992, encontró que el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC) aceleraba el cierre primario de la herida. Recientes estudios sugieren que el PRFC posee potentes efectos angiogénicos (Anitua, 2006), lo cual favorece también la cicatrización de los tejidos. En relación al efecto antiinflamatorio, autores como El-Sharkawi et al., 2007 han descrito que el PRFC produce el bloqueo de la Proteína Quimiotáctica de Miocitos tipo 1(MCP-1), liberada por los monocitos, lo que reduce el efecto inflamatorio.

En el tratamiento de la estomatitis aftosa, Aminabadi, 2008 ha observado que el PRFC es un buen candidato para la resolución de estas úlceras, por el efecto antiinflamatorio y cicatrizador que poseen los factores de crecimiento, como es el caso del TGFB. En úlceras crónicas cutáneas, se ha observado también la capacidad reparadora del PRFC, ya que además de las características previamente comentadas, al elaborar el gel del PRFC, éste

actúa como una membrana hemostática de gran elasticidad que favorece la curación de los tejidos de alrededor (Anitua et al., 2008).

En un estudio efectuado también con conejos neozelandeses, Lee et al., 2008, obtuvieron diferencias aunque no estadísticamente significativas al aplicar Plasma Rico en Plaquetas (PRP) infiltrada en heridas producidas en piel. Sí pudieron observar que la aplicación del PRP aceleraba la reepitelización y la neogénesis vascular en las heridas.

En relación a la aplicación PRFC en forma de gel, diversos autores, tras su aplicación en heridas, han observado buenos resultados en distintos campos de la medicina. En cardiología se ha observado que acelera la cicatrización en heridas profundas (Centella et al., 2005). En cirugía artroscópica, Sánchez et al., 2003, observó que minimiza los hematomas y signos inflamatorios posquirúrgicos.

El tratamiento de úlceras crónicas de origen vascular o las úlceras neuropáticas, ha sido uno de los retos de la medicina actual. Diversos autores (Steed, 1995; Margolis et al., 2001; Escolto et al., 2001; Martí-Mestre et al., 2005; Anitua et al., 2008) han conseguido estimular la curación de estas úlceras con la aplicación tópica de PRFC en gel, además de conseguir una menor inflamación y menos sintomatología en los pacientes en los que se aplicaba dicho biomaterial.

El PRFC en forma líquida está siendo ampliamente utilizado en distintos campos de la medicina. En implantología oral, autores como Anitua han conseguido una mejor estabilidad primaria y osteointegración de los implantes tras humedecer la superficie de los implantes con PRFC (Anitua et al. 2005). En oftalmología ha sido utilizado con éxito en el tratamiento de la xeroftalmia ú ojo seco, y como cicatrizante posquirúrgico en las cirugías con láser de CO<sub>2</sub> (Alio et al., 2007a; Alio et al., 2007b). En la actualidad en medicina estética, el PRFC se usa en inyecciones subcutáneas para disminuir la profundidad de las arrugas faciales y acelerar la cicatrización. Se usa también para reducir la

inflamación postoperatoria, obteniéndose buenos resultados en cirugía estética. (García-Jiménez et al., 2005; Hernández et al., 2005).

El estudio de los efectos del PRFC o Capa Leucoplaquetar se realizó transcurridos 1, 2, 4 y 5 semanas con el fin de establecer la adhesión de dicha Capa Leucoplaquetar a la superficie de los implantes de titanio puro mecanizados. Estos periodos de tiempo fueron utilizados con anterioridad por varios autores (Aghaloo et al., 2002; Prior et al., 2005; Gerard et al., 2006), ya que es el periodo en el que se comienza a formar el nuevo hueso inmaduro y se va produciendo la osificación endocondral hasta formar el hueso maduro (Garcés, 1993). Además el recambio óseo de los conejos neozelandeses es mucho mayor, por poseer una gran capacidad osteoformadora (Sommerfeldt y Rubin, 2001), por lo que el remodelado óseo del injerto autólogo ocurre entre las 6 y 8 semanas postcirugía (Roberts et al., 1984; Bogoch et al., 1993; Watanabe et al., 1999). Gerard et al., 2006 observaron que el PRP aumentaba la formación de hueso y la remodelación en el primer y segundo mes, mientras que este beneficio disminuía entre los 3 y los 6 meses.

Estos efectos tempranos pueden estar causados por dos procesos diferentes. 1) El PRP incrementa la formación de hueso nuevo probablemente por el incremento del número de osteoblastos que eran activos en el lugar del injerto y 2) la cantidad de hueso injertado no viable que fue desechado del lugar del injerto, posiblemente por el aumento del número de osteoclastos activados en dicho lugar.

Aghaloo et al., 2002, realizó un estudio piloto en el que realizaba 4 osteotomías con trefinas en el cráneo de 15 conejos Neozelandeses, las cuales rellenaba con PRP, PRP + injerto óseo, injerto óseo sólo y una osteotomía usada como control. Estos autores encontraron que al comparar las osteotomías de control o rellenadas con PRP sólo, no existían diferencias significativas ni al mes, ni a los dos meses. A la comparación de las osteotomías rellenadas con autoinjerto + PRP o autoinjerto sólo, tampoco encontraron diferencias significativas ni al mes ni a los dos meses.

Wiltfang et al., 2004, realizaron un estudio en minipigs, a los que provocaron defectos en la zona frontal del cráneo y les colocaban PRP mezclado con hueso autólogo, gránulos de fosfato tricálcico, gránulos de hueso bovino esponjoso (BioOss), y esponjas de colágeno inductoras de hueso bovino. Les realizaron radiografías y observaron que a las dos semanas, el grupo tratado con PRP y hueso autólogo presentaba diferencias significativas en la remineralización comparado con el grupo tratado con hueso autólogo exclusivamente. A las 4 semanas, no observaron diferencias significativas entre la aplicación de hueso autólogo o hueso autólogo mezclado con PRP.

Swennen et al., 2005, realizó un estudio con ovejas adultas, en las que realizó distracciones óseas. Concluyó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre la aplicación o no del PRP con hueso autólogo en los procesos de distracción ósea.

Pryor et al., 2005, realizaba osteotomías en el cráneo de 32 ratas Sprague-Dawley, y rellenaba los defectos con PRP mezclado con esponjas de colágeno reabsorbible o con esponjas solamente. Observó que a las 4 y 8 semanas de realizar la cirugía, radiológicamente no existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la utilización o no de PRP en la regeneración ósea.

El grupo de estudio de Gerard et al., 2006, realizó defectos en el cuerpo mandibular de perros Beagle, y rellenaron la mitad con injertos autólogos de hueso sólo, y la otra mitad con hueso autólogo mezclado con PRP. Realizaron radiografías y observaron que al mes, la zona de injerto sólo tenía una mayor densidad radiológica que la zona de injerto mezclado con PRP, y además con diferencias estadísticamente representativas. En cambio a los dos meses, aunque la zona del injerto sólo seguía siendo más densa, estas diferencias ya no eran estadísticamente significativas. Este estudio se continuó hasta los 6 meses, no encontrándose diferencias entre los dos grupos.

Se ha observado que en las células tumorales se produce un aumento de formas normales de receptores de los factores de crecimiento que podrían

favorecer el crecimiento y la invasión de éstas. En una amplia variedad de tumores mesenquimales (lipomas, hemangiomas, angiosarcomas, etc.) se ha observado una sobreexpresión del factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

Palman et al., 1992, además dichas células producen una sobreexpresión de factores de crecimiento que estimulan la proliferación de las células estromales (fibroblastos y células endoteliales) necesarias para el crecimiento de tumores sólidos (Woodburn, 1999). Otro fenómeno a tener en cuenta es la capacidad de las plaquetas para facilitar el proceso de metástasis de las células tumorales, y además se ha observado que estas células tumorales facilitan la agregación plaquetaria liberando el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) que las plaquetas necesitan para su invasión celular. A algunos factores de crecimiento incluidos en el PDGF, se les han asignado capacidades antiapoptóticas, como el IGF (Factor de Crecimiento Similar a la Insulina) o el VEGF (Kato et al., 1995; Pollack, 2000).

Otros factores como el Factor de Crecimiento derivado de las Plaquetas (PDGF) estimula la activación de una proteína quinasa C, que está implicada en la progresión del ciclo celular en el paso G2/M (Caelles y Muñoz, 1999). Por tanto y aunque no hay evidencias científicas que relacionen la aplicación terapéutica del PRFC o factores de crecimiento con la transformación carcinomatosa de tejidos normales o displásicos, sí se aconseja evitar su utilización en tejidos con condiciones precancerosas ó en la proximidad de lesiones precancerosas (Martínez González et al., 2002).

El estudio previo realizado para ver la adhesión o no, de células mononucleares y capa leucoplaquetar o PRFC in vitro, se basa en los cultivos que se realizan para comprobar la viabilidad celular de determinados pacientes con patologías hematológicas y que pudieran ser posibles candidatos a un futuro trasplante de médula, utilizando una modificación de la técnica de Boyum (Boyum, 1968). A priori, nada hacía presagiar que al poner en contacto con dichos cultivos implantes de titanio puro, hubiera algún tipo de respuesta positiva.

Pensando que lo más natural sería que los implantes se quedaran tal cual se habían introducido en las placas de Petri, y que hubiera una actividad celular acorde con este tipo de cultivos o que por el hecho de introducir un elemento nuevo, el implante, se arruinara todo el cultivo. Se hizo una primera lectura a los 7 días, y como se vio actividad celular, se llevo a cabo a término, esto es 14 días.

La sorpresa fue que no sólo habían proliferado las células en el medio, sino que también había una capa celular alrededor de los implantes. Por si fuera producto de la casualidad, tantas veces presente en trabajos de investigación, se repitió este estudio previo, diversificando los implantes en varias placas y extremando la protocolización para tener constancia firme de todos los pasos dados.

En dichos nuevos cultivos se volvió a observar el mismo comportamiento de los implantes. Así ya sin dudas respecto al protocolo instaurado, pudimos observar que mientras que en los implantes cultivados con el agregado plaquetar o PRFC, no se adhería de igual manera o incluso no había adherencia en todos los implantes sembrados, en el caso de las células mononucleares el crecimiento era constante en todos los cultivos. Más aún, a la hora de despegarlos para su contaje e identificación, no pudimos lograrlo ni siquiera con centrifugaciones sucesivas de suero, tripsina y quimiotripsina.

Alentados por este logro inesperado, decidimos dar el paso lógico y necesario para comprobar si la experiencia era también igual de positiva en un modelo experimental animal (Arruga et al., 2000, 2002, 2003).

Para ello se diseñaron dos grupos de animales de experimentación, conejos albinos neozelandeses en donde se colocaron en la zona del tercio distal del fémur derecho del animal, dos implantes incubados, uno con capa leucoplaquetar y otro con cmn. Asimismo y al mismo nivel se realizaron sendos taladrados del mismo diámetro que el implante, sin implante pero con la inclusión en cada neoalveolo de CLP o CMN.

Se programó el sacrificio a los 7, 14, y 30 días. Observamos que los resultados eran completamente coherentes con el cultivo *in vitro*. Así, los implantes incubados con CLP, sin ir mal, no tenían un patrón constante, mientras que los incubados con cmn eran más constantes. También observamos que en los lugares en los que solamente habíamos realizado un fresado del neoalveolo, no existía correspondencia de maduración ósea con el implante incubado con la misma celularidad, bien fuera CLP o CMN.

Khan et al., 2000 ya comentan que el hecho de colocar un implante intraóseo incrementa en un 30% la actividad respecto a una zona en la que solo se realizó el fresado pero no se introdujo ningún implante.

En la comparación entre el desplazamiento medio (rigidez) tras el sometimiento a carga en cada período de tiempo (0 días, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días) en función del grupo: con concentrado (CMN) o sin concentrado (control), se observó que el resultado de los primeros 7 días es estadísticamente significativo (día de la intervención  $p=0.001$ ; 1ª semana 1-7 días  $p<0,001$ ), mientras que en los siguientes 21 días no lo es (2ª semana 8-14 días  $p=0,158$ ; 3ª semana 15-21 días  $p=0,309$ ; 4ª semana 22-28 días  $p=0,206$ ). Esto puede ser atribuido a que dichos implantes están “vivos”, y tienen una actividad celular doble. Esto es, hacia el implante y hacia su geometría y hacia el hueso circundante con su remodelación celular activa. El concentrado de células mononucleares “colonizaría”, ocuparía la zona de interfase hueso-implante sobre todo en donde exista hueso esponjoso (zona de la rosca preferentemente) actuando a modo de “cemento” que le conferiría localmente una cierta rigidez, hasta que dichas células se diferenciases ó murieran por apoptosis dando lugar a la remodelación del hueso. Este hecho también se ha observado en el humano entre los días 10-20 (Serrano y Mariñoso, 1990).

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son:

1. La mitad de los implantes, independientemente de si tuvieran o no tratamiento de superficie con CLP o CMN, necesitaron una fuerza de desinserción (torque) superior a 20 Newtons.
2. Los implantes tratados con CMN requirieron una mayor fuerza de desinserción que los tratados con CLP o los no tratados, con diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ).
3. A nivel del cuello del implante, más de la mitad de los mismos presentaban una maduración ósea intensa; a nivel de la rosca, casi la mitad implantes mostraban también maduración ósea intensa.
4. Los implantes tratados con CLP o CMN tenían un mayor grado de maduración ósea que los no tratados, tanto a nivel del cuello sin relación estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ), como a nivel de la rosca, donde sí se halló esta asociación significativa ( $p < 0,05$ ).
5. Los implantes tratados con CMN tiene menores desplazamientos medios dentro del lecho óseo tras su sometimiento a carga en todos los períodos analizados: momento de colocación del implante y a los 7, 14, 21 y 28 días de la colocación de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA  
ORDENADA

Adams DO. The granulomatous inflammatory response. *Amer J Pathol.* 1976; 4: 164-191.

Aimetti M, Romano F, Dellavia C, De Paoli S. Sinus grafting using autogenous bone and platelet-rich plasma: histologic outcomes in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2008; 28: 585-91

Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of Platelet-Rich Plasma in rabbits cranial defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60: 1176-1181.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, eds. *The Cell.* Nueva York: Garland Publishing Inc; 1994.

Albrektsson T, Johansson C, Lundgren AK, Sul YT, Gottlow J. Experimental Studies on oxidized implants. A histomorphometrical and biomechanical analysis. *Applied Osseoint Res.* 2000; 1: 21-4.

Alio JL, Colecha JR, Pastor S, Rodríguez A, Artola A. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res.* 2007; 39: 124-129.

Alio JL, Pastor S, Ruiz Colecha J, Rodríguez A, Artola A. Treatment of ocular surface syndrome alters LASIK with autologous platelet-rich plasma. *J Refract Surg.* 2007; 23: 617-619.

Aminabadi N. Plasma rich in growth factors as potential therapeutic candidate for treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Medical Hypotheses.* 2008; 70: 529-531.

Anderson M, Miller KM. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials.* 1984; 5: 5-10.

Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008; 84 B: 415-421.

Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 429-535.

Anitua E. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Puesta al día. Vitoria: Publicaciones, S.L.; 2000.

Anitua E, Andia I, Sanchez M, et al. Autologous preparations in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J. Orthop Res.* 2005, 123: 281-286.

Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, et al. New insights into and novel applications for platelet rich fibrin therapies. *Trends in Biotech.* 2006; 24: 227-234.

Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, et al. Reciprocal actions of platelet-secreted TGF B-1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 119: 950-959.

Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, et al. Autologous fibrin matrices: A potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mat Res.* 2006; 77A; 285-293.

Anitua E. La utilización de los factores de crecimiento plasmáticos en cirugía oral, maxilofacial y periodoncia (PRGF). *RCOE* 2001; 6; 305-315.

Antonides HN, Owen AJ. Growth factors and regulation of cell growth. *Ann Rev Am Cell.* 1982; 33: 445-63.

Antonides HN. Human platelet -derived growth factor (PDGF): Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1981; 78: 7314-7.

Arbes H, Bösch P, Salzer M. First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting, combined with the fibrine adhesive system (F.A.S). *Arch Orthop Trauma Surg.* 1981; 98:183-8.

Arriaza R, Fernandez JC, Aizpurua J, Couciero G. Resultados del tratamiento de retardos de consolidación de huesos largos con ondas de choque extracorpóreas y plasma rico en factores de crecimiento. Acta Ortopédica Gallega 2005; 1: 41-44.

Arruga A. Obtención de células Mononucleares. 2003. Patente Española de Invención nº ES 2 222 099 A1.

Arruga A. Método de Obtención de la Capa Leucoplaquetar y Gel de aplicaciones. 2002, Patente de Invención Española ES 2 211 276 A1.

Arruga A, Gomez F, Moreno JA, Castiella T, Arruga C. Intri: a la búsqueda del implante ideal. Primer Congreso Mundial de la Academia de Odontología Integral. Lima (Perú), abril 2000.

Arruga A, Gómez F, Moreno JA, Castiella T, Pérez del Palomar A. Células Mononucleares. Nuevo enfoque biológico de su adherencia a implantes de titanio puro Sistema Intri. Estudio in Vitro y en animales experimentales. Madrid 2005. Master de Implantología y Medicina Legal de AFEERO. Universidad Paul Sabatier-Toulouse III.

Arruga A, Gomez F, Moreno JA, Castiella T, Perez del Palomar A. Células Mononucleares: nuevo enfoque biológico de su adherencia a implantes de titanio puro sistema Intri. Estudio in Vitro y en animales experimentales. I Congreso Mundial de la S.E.I. Barcelona, mayo 2002.

Arruga A, Gomez F, Moreno JA, Marin S, Cativiela E. Evaluación de la adherencia de células hematológicas periféricas a implantes dentales de titanio sistema Intri. Estudio in Vitro. Rev Esp Odont Impl. 2001; 9: 99-106.

Arruga A. Implante Dental y método operativo de Implantación. Patente de Invención Española ES 2000 2 179 731 A1.

Arruga A: Dental Implant and operative method of Implantation. 2001, Patente Americana nº US 2001/0031445 A1.

Arruga, A: Mejoras introducidas en la Patente de Invención nº P- 2000 00984 por: Implante Dental y Método Operativo de Implantación. 2002, Patente Española de Invención ES 2 212 883 A1.

Aubin JE, Turksen K, Hersche JNM. Osteoblastic cell Lineage. En: Noda M, ed. Cellular and Molecular Biology of Bone. San Diego; Academic Press Inc, 1993. p. 1-45.

Autian J. Implantation methods for biological testing of dental materials. Int Endod J. 1981; 14: 107-114

Babbush CA, Kent JN, Misiek DJ. Titanium plasma-sprayed (TPS) screw implants for the reconstruction of the edentulous mandible. J Oral Maxillofac Surg. 1986; 44: 274-82.

Bagnali RD. An approach to the soft tissue/ synthetic material interface. J Biomater Res. 1977; 11: 969-946

Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Inghan E, Walters C, Selby PJ. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelet: significance for VEGF measurement and cancer biology. Br J Cancer. 1998; 77: 956-964.

Barnes G, Kostenuik P, Gerstenfeld, L, Stienhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. J. Bone Min. Res. 1999; 14: 1805-1815.

Berglundh T, Lindhe J, Marinello C. et al. Soft tissue reaction to the new plaque formation on implants and teeth. Clin Oral Implant Res 1992; 3: 1-8.

Bernstein ID, Andrew RG, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> cells, and generation of colony-forming cell progeny from CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> cells cultured with Interleukin3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood. 1991; 77: 2316-2321.

Bessing C, Kallus T. Evaluation of tissue response to dental alloys by subcutaneous implantation. *Acta Odontol Scand.* 1987; 45: 247-255

Bethmann W, Knofler W. Geweberaktionen auf implantatierte Materialien . *Zahnarztl Prax.* 1987; 5: 162-168

Bianchi AE, Gallina G, Fascina R, Sanfilippo F, Zaffe D. Morphostructural relationships between bone and implant: comparative analices by optical microscopy and microradiography. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1997; 17: 552-61

Braccini F, Tardivet L, Dohan Ehrenfest DM. The relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin (PRF) during middle ear surgery: Preliminary results. *Rev Laryngol Otol Rhinol.* 2009; 130: 175-180.

Bobyn J D, Pilliar R M, Cameron H U, Weatherly G C. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clin Orthop.* 1980; 150: 263-270.

Bogoch E, Gschwend N, Ranh B, Moran E, Perren S. Healing of cancellous bone osteotomy in rabbits. Part 1. Regulation of bone volume and the regional acceleratory phenomenon in normal bone. *J Orthop Res.* 1993; 11:285-291.

Bolufer P. Factor de crecimiento epidérmico y su papel en el desarrollo tumoral. *Oncología* 1988;11; 1-7.

Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968; 217: 77-89

Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983; 50: 399-410.

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.

Branemark PI. Introduction to osseointegration. In: Branemark PI, Zarb GA, Albrekson T, eds. Tissue-integration protheses. Osseointegration in Clinical Dentistry. Berlin: Quintessenz; 1985. p. 11-76.

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

Buser D, Schroeder A, Sutter F, Lang N. Das neue ITI-implantatkonzep-Indikationen und klinische Aspekte. Quintessenz . 1992; 40: 17-20.

Byers PD, Woods CG. The Growth Arquitecture and Structure of Bone. En: Salisbury JR, Woods CG and Byers PD, eds. Diseases of Bones and Joints. Londres: Chapman & Hall Medical; 1994. p. 509-526.

Caelles C, Muñoz A. Oncogenes nucleares. Rev Cancer. 1999; 13: 27-40.

Cano Sanchez J, Martinez-Gonzalez JM, Campo-Trapero J. Biología osea periimplantaria. Periodoncia 2002; 6: 345-56.

Casati MZ, de Vasconcelos Gurgel BC, Gonçalves PF, Pimentel SP, da Rocha Nogueira Filho G, Nociti FH Jr, Sallum EA. Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects--a pilot study in dogs. Int J Oral Maxillofac Surg. 2007; 36: 132-6.

Centella T, Oliva E, García JC, Huélamo T, Lamas MJ, Maseda R, Epeldegui A. Tratamiento de las heridas infectadas tras cirugía cardiaca con la utilización de plasma rico en factores de crecimiento. Resultados preliminares. Ann Cir Card Vasc. 2005; 4: 208-213.

Chiapasco M, Gatti C, Rossi E, Haefliger W, Markwalder T. Implant-retained Mandibular Overdentures with Immediate Loading: results on 226 consecutive cases. Clin Oral Implants Res. 1997; 8: 48-57.

Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. An opportunity in perio-implantology: The PRF. *Implantodontie* 2001; 42: 55-62.

Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101: E56-60.

Clark RE, Boyd JC, Moran JF. New principles governing the tissue reactivity of prosthetic materials. *J Surg Res.* 1974; 16: 510-522

Cohen J. Assay of foreign-body reaction. *J Bone Surg.* 1959; 41: 152-166.

Cook SD, Weinstein AM, and Klawitter JJ. A three dimensional finite element analysis of a porous rooted Co-Cr-Mo alloy dental implant. *J Dent Res.* 1982; 61: 25-29

Coleman DI, King RN, Andrade JD. The foreign body reaction: a chronic inflammatory response. *J Biomed Mater Res.* 1974; 8: 199-211.

Coleman DI, King RN, Andrade JD. The foreign body reaction: an experimental protocol. *J Biomed Mater Res.* 1974; 5: 65-76

Consolo U, Zaffe D, Bertoldi C, Ceccherelli G. Platelet-rich plasma activity on maxillary sinus floor augmentation by autologous bone. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18: 252-62.

Cordioli G, Majzoub Z, Piatelli A, Scarano A. removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: An experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 2000; 15:668-74.

Crofts RD, Boyce TM, Bloebaum RD. Aging changes in osteon mineralization in the human femoral neck. *Bone.* 1994; 15: 147-152.

Cronin R. The current most pressing concerns of implant dentistry. *Perspectives Impl Dent.* 2002; 11:13-5.

Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* 1998; 11: 391-401.

De Obarrio LL, Aruz Dutari JL, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol.* 2003; 74: 858-864.

De Coster TA. Biomechanical Principles Related to the Musculoskeletal System. En: Bronner F, Worrell M, eds. *A Basic Science Primer in Orthopaedics.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p. 149-170.

Del Fabbro M, Boggian C, Taschieri S. Immediate implant placement into fresh extraction sites with chronic periapical pathologic features combined with plasma rich in growth factors: preliminary results of single-cohort study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 67: 2476-84

Deporter DA, Todescan R, Dominguez-Campillo L. Implantes de superficie rugosa sinterizada: aprovechamiento de ventajas clinicas únicas. *Periodoncia.* 2002; 6: 369-82.

Donath K. Vergleichende histologische Untersuchung verschiedener enossaler Implantattypen. *Z Zahnaerztl Implantol.* 1988; 4:106-108.

Donath K, Kirsch A. Welche Bedeutung hat die primäre Stabilisation von implantaten für die ossäre integration während der Einheilphase? *Z Zahnartl Implantol.* 1986; 2: 11-17.

Donath K, Laab M, Gunzl HJ. The histopathologie of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Arch Abt.* 1992; 420: 131-137.

Donath K, Schulze-Quester R. Morphologische Untersuchungen gingivaler Gefäße bei Gingivitis unter dem Einfluß der supra- und subgingivalen Plaques. *Ost Z Stomatol.* 1983; 80: 46-60.

Dugrillon A, Eichler H, Cern S, Kluter H. Autologous concentrate platelet rich plasma for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 31: 605-619.

Eisenring R, Wirz J, Rahn BA, Geret V. Biologische Prüfung von zahnärztlichen aufbrennlegierungen. *Schweiz Mschr Zahnmed.* 1986; 3: 500 -520.

Elias JA, Tang W, Howitz MC. Cytokine and Hormonal stimulation of human osteosarcoma cytokine-11 production. *Endocrinol.* 1995; 136: 489-498.

El-Sharkawi H, Kantarci A, Deady J, et al. Platelet rich plasma: growth factors and pro and anti-inflammatory properties. *J Periodontol.* 2007; 78: 661-669.

Engelke W, Sohar S, Schwartz W. Enhancement of primary stability of dental implants using cortical satellite implants *Implant Dent.* 2002; 11: 52-7

Ericsson I, Randow K, Nilner K, Petersson A. Early functional loading of Branemark dental implants: 5-year clinical follow-up study. *Clin Oral Implant Res.* 2000; 2: 70-7.

Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F. Bone histology and bone histomorphometry. En: Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F, eds. *Bone Histomorphometry.* Nueva York: Raven Press; 1994. p. 33-48.

Eriksson AR, Berglundh T, Marinello C, Liljenberg B, Lindhe J. Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clin Oral Implant Res.* 1992; 3: 99-103.

Escotto I, Rodríguez JM, Padilla M, Rodríguez N. Factores de crecimiento en el tratamiento de úlceras en pacientes diabéticos. *Rev Mex Angiol.* 2001; 29: 85-92.

Esnaola MM. Diagnóstico y tratamiento de las coagulopatías. [acceso 21 febrero 2008]. Disponible en: <http://www.neurologiaediris.es/congreso-1/conferencia/vascular-2.htm>.

Everts PAM, Devilee RJJ, Brown Mahoney C, Eeftinck-Schattenkerk M, Box HAM, Knape JTA, Van Zundert A. Platelet gel and fibrin sealant reduce allogeneic blood transfusions in total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006; 50: 593-599.

Florensa L, ed. Hematopoyesis, morfología de los elementos formes de la sangre y órganos hematopoyéticos. *Hematología clínica de Sans-Sabrafen*, 4ª ed. Madrid: Harcourt; 2001. p. 1-33.

Fontana S, Olmedo DG, Linares JA, Guglielmotti MB, Crosa ME. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Implant Dent*. 2004; 13: 73-8.

Frost HM, Straatsma CR. Bone remodelling dynamics. *Plastic Reconstr Surg*. 1964; 33: 196-8.

Frost HM. Mechanical determinants of bone remodelling, *Metab Bone Dis*. 1982; 4: 217-229.

Garcés CL. Fisiopatología del callo de fractura. En: De Pedro JA, Pérez AJ., eds. *Fractura*. Buenos Aires: Panamericana; 1993. p. 3-12.

García-Gimenez J, Gonzalez JA. Tratamiento del envejecimiento cutáneo mediante estimulación con factores de crecimiento autógenos. *Int J Cosmetic Surg Med*. 2005; 7: 8-17.

Garg AK. The use of platelet rich plasma to enhance the succes of bone grafts around dental implants. *Dent Imp Update*. 2000; 11: 17-20.

Garg AK, Gargese D, Peace I. Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. *Dent Implantol Update*. 2000; 11: 41-4.

Gatti C, Haefliger W, Chiapasco M. Implant-retained mandibular overdentures with immediate loading: a prospective study of ITI implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000; 15: 383-8.

Geesink RG, de Groot K, Klein CP. Chemical implant fixation using hydroxyapatite coatings. The development of a human total hip prótesis for chemical fixation to bone using hydroxyapatite coatings on titanium substrates. *Clin Orthop Rel Res*. 1987; 225: 147-170.

Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 64: 443-451.

Geret V, Rahn BA, Mathys R, Straumann F, Perren SM. A method of quantitative determination of tissue tolerance in decreased relative movement between implant and tissue. *Helv Chir Acta*. 1979; 46: 189-93.

Gonzalez Macias J, Serrano Figueras S. Enfermedades óseas. En: Farreras P, ed. *Medicina Interna*, 13ª ed. Madrid: Mosby-Doyma; 1995. p. 1064-1089.

Goodman JW and Hodgson GS. Evidence for stem cells in the peripheral Blood of mice. *Blood*. 1962; 19: 702-714.

Gottlander M, Albrektsson T, Carlsson L. A histomorphometric study of unthreaded hydroxyapatite-coated and titanium-coated implants in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992; 7: 485-90.

Gottlow J, Henry P, Tan A, Allan B, Johansson C, Hall J. Biomechanical and histologic evaluation of the TiUnite and Osseotite implant surfaces in dogs. *Applied Osseoint Res*. 2000; 1: 28-30.

Gottlow J, Johansson C, Albrektson T, Lundgren A-K. Biomechanical and Histologic evaluation of the TiUnite and Osseotite implant surfaces in rabbits after 6 weeks of healing. *Applied Osseoint Res.* 2000; 1: 25-7

Gruber R, Varga F, Fisher MB, Watzek, G. Platelet stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin. Oral Implants Res.* 2002; 13: 529-535.

Gurley AM, Roth SI. Bone. En Sternberg SS, ed. *Histology for Pathologists.* New York: Raven Press; 1992. p. 61-80.

Hernandez JA, Serrano S, Mariñoso ML, Aubia J, Lloreta J, Marrugat J, Diez A. Bone growth and modeling changes induced by periosteal stripping in the rat. *Clin Orthop.* 1995; 320: 211-219.

Hernandez I, Rozan G, Dávila M. Reingeniería de tejidos. Plasma rico en plaquetas como inductor de reparación en la paniculopatía edematofibroesclerótica. *Int J Cosmetic Surg Med.* 2005; 7: 18-24.

Hirsch BC, Johnson WC. Concepts of granulomatous inflammation. *Int J Dermatol.* 1984; 23: 90-100

Hoffman R, Benz E, ed. *Hematology: Basic principles and practice.* 4<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005.

Huang HM, Cheng KY, Chen CF, Ou KL, Lin CT, Lee SY. Design of a stability-detecting device for dental implants. *J Engineering Med.* 2005; 4: 203-211.

Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD. Potencial of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res.* 1970; 4: 433-456.

Ibanez JC, Jalbout ZN. Immediate loading of osseotite implants: 2-year results. *Implant Dent.* 2002; 11: 128-36.

Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 579-86.

Jang ES, Park JW, Kweon H, Lee KG, Kang SW, Baek DH, Choi JY, Kim SG. Restoration of peri-implant defects in immediate implant installations by Choukroun platelet-rich fibrin and silk fibroin powder combination graft. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: 831-6.

Johnsons BW. Ha-coated dental implants. Long-term consequences. *J Calif Dent Assoc.* 1992; 9: 8-10.

Kaminski EJ, Shenk MW, Oglesby RJ. Presence of adipose fat as a criterion of implants compatibility. *J Biomed Mater Res.* 1977; 11: 871-881.

Khan O, Archibald A, Thomson E, Maharaj P. The role of quantitative single photon emission computerized tomography (SPECT) in osseous integration Process of dental implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 90: 228-32.

Kassolis JD, Reynolds MA. Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *J Craniofac Surg.* 2005;16: 280-7.

Katoh O, Tauchi H, Kawaishii K, Kimura A, Satow I. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF of apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.* 1995; 55: 5687-5692.

Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Platelet rich plasma derived clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol.* 2003; 74: 858-864.

Keller F, Knofler W, Schreiber H, Hess J, Wohlgemuth B. Zur biokonpatibilität von implantaten mit und ohne Fluorkohlenwasserstoff-Glimmpolymerbeschichtung. 3. Mathematische Modellierung des abklingprozesses der Bindegewebsreaktion. Z exp Chir Transplant. 1984; 17: 330-336.

Kent J, Block MS. Biointegrated Hydroxylapatite-coated dental implants in 5 year clinical observation. J Am Dent Assoc. 1990; 38: 121-138.

Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Boyan BD. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. J Biomed Mater Res. 1996; 32: 55-63.

Kirsch A, Achermann KL. IMZ-long-term survival rates exceed 95% interfore. Dent Update. 1991; 4: 1-5.

Kirsch A, Montag PJ. The IMZ endosseous implant system. A complete oral rehabilitation treatment concept. J Oral Implantol. 1986; 12: 576-80.

Klawitter JJ, Weinstein AM. The status of porous materials to obtain direct skeletal attachment by tissue ingrowth. Acta Orthop Belg. 1974; 40: 755-765

Klokkevold P, Nishimura R, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in rabbit. Clin Oral Impl Res. 1997; 8: 442-7.

Klongnoi B, Rupprecht S, Kessler P, Thorwarth M, Wiltfang J, Schlegel KA. Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation. An explorative study. Clin Oral Implants Res. 2006; 17: 312-20.

Knabe C, Stiller M, Berger G, Reif D, Gildenhaar R, Howlett CR, Zreiqat H. The effect of bioactive glass ceramics on the expression of bone-related genes and proteins in vitro. Clin Oral Implants Res. 2005; 16: 119-27.

Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH. Role of platelet and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg.* 1982; 196: 379-388.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cells. *Cell.* 2001; 103: 369-377.

Krauser J. Hydroxylapatite-coated dental implants biologic rational and surgical technique. *Dent Clin North Am.* 1989; 33: 879-86.

Lakey LA, Akella R, Ranieri JP. Angiogenesis: Implacations for tissue repair. En: Davies JE, ed. *Bone engeneering.* Toronto: Em Squared; 2000. p. 137-142.

Laricchia-Robbio L, Nucifora G. Significant increase of self-renewal in hematopoietic cells after forced expression of EVI 1. *Blood Cells Mol Dis.* 2008; 40: 141-147.

Lee HW, Reddy MS, Geurs N, et al. Efficacy of Platelet- Rich Plasma on wound healing in rabbits. *J Periodontol.* 2008; 79: 691-696.

Lekovic V, Camargo PM, Winlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of platelet rich plasma, bovinous porous bone minaral and guided tissue regeneration versus platelet rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J Periodontol.* 2002; 73: 198-205.

Lenz P. The morphology and function of the periodontal vascular system. *J Dent Assoc South Afr.* 1975; 30: 63-68.

Li J, Liao H, Fartash B, Hermansson L, Johnson T. Surface-dimpled commercially pure titanium implant and bone ingrowth. *Biomaterials.* 1997; 18: 691-696.

Lian JB, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992; 3: 269-305.

Liebermann JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of the bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84; 1032-1044.

Linkow LJ, Donath K, Lemons JE. Retrieval analyses of a blade implant after 231 months of clinical function. *Implant Dent.* 1992; 1: 37-43.

London R, Roberts F, Baker D, Rohrer M, O'Neal R. Comparación histológica entre los principales sistemas utilizados en la actualidad. *Periodoncia.* 1999; 9: 195-204.

Luginbuehl V, Meinel L, Merckle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 58: 197-208.

Maeztu M, Alava J, Gay- Escoda C. Ion implantation: Surface treatment for improving the bone integration of titanium and Ti6Al4Va dental implants. *Clin Oral Impl Res.* 2003; 14: 57-62.

Maeztu M, Gómez M, Arévalo E, Alava E, Alonso F. Análisis estructural de los principales sistemas utilizados en la actualidad. *Periodoncia.* 1999; 9: 195-204.

Mannai C. Early implant loading in severely resorbed maxilla using xenograft, autograft, and platelet-rich plasma in 97 patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 64: 1420-6.

Mancuso V, Bennion A, Hull DJ. Platelet rich plasma: a preliminary report in routine impacted third molar surgery and the prevention of alveolar osteitis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61: 36-41.

Manolagas SC, Jilka BL. Bone Marrow, Cytokines and bone remodeling. *N Engl J Med.* 1995; 332: 305-311.

Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1995; 332: 305-311.

Margolis DJ, Kantor J, Santana J, Strom BL, Berlin JA. Effectiveness platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care*. 2001; 24: 483-488.

Martí-Mestre FX, Acosta-Gomez M, Bonell-Pascual A, Linarez-Ruiz P, Romera A, Iñiguez-Navas C, Lapiedra-Mur O. Resultados preliminares de la aplicación de factores de crecimiento en el tratamiento de las úlceras vasculares. *Angiología* 2005; 57: 335-343.

Martin D. Activación oncogénica de receptores tirosina-quinasa. *Rev Cancer* 1985; 9: 202-218.

Martinez Gonzalez JM, Cano J, Gonzalo JC, Campo J, Esparza GC, Seoane JM: ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *Med Oral*. 2002; 7: 375-390.

Martinez-Valverde AM, Lorenzo M. Transducción de señales mitogénicas y de diferenciación celular. *Rev Cancer* 1999; 13: 100-109.

Marx RE. Platelet rich plasma: a source of multiple autologous growth factor for bone grafts. En: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE, eds. *Tissue Engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Illinois: Quintessence; 1999. p. 71-82.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SE, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 638-646.

May D, Romanos GE. Immediated implant-supported mandibular overdentures retained by conical crowns: A new treatment concept. *Quintessence Int*. 2002; 33: 5-12.

Mazor Z, Peleg M, Garg AK, Luboshitz J. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent*. 2004; 13: 65-72.

McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and Epo stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Experimental Hematol.* 1991; 19: 226-231.

Melsen B, Costa A. Carga inmediata de implantes utilizados como anclaje en ortodoncia. *Acta Dent Int.* 2000; 1: 205-210.

Melsen B, Lang N.P. Reacciones biológicas del hueso alveolar a la carga ortodóntica de implantes orales. *Acta Dent Int.* 2001; 2: 221-231.

Meredith N, Book K, Friberg B. Resonance frequency measurements of implant stability in vivo. *Clin Oral Impl Res.* 1997; 8: 226-33.

Meredith N, Shagaldi F, Alleyne D, Sennerby L, Cawley P. The application of resonance frequency measurements to study the stability of titanium implants during healing in the rabbit tibia. *Clin Oral Impl Res.* 1997; 8: 234-43.

Miiyazaka K, Mori Y, Yuasa T, Schiokava M, Nakamaru Y, Mano H, Hakeda Y, Kameda A, Kumegawa M. Vitamin K2 inhibits osteoclastic bone resorption by inducing osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 220: 515-519.

Millenium Research Group. A Decision Resources Inc. Millennium research group releases new dental market research data, 2010. [acceso 3 febrero 2010]. Disponible en: <http://www.mrg.net/News-and-Events/Press-Releases/MILLENNIUM-RESEARCH-GROUP-RELEASES-NEW-DENTAL-MARK.aspx>

Moreno-Reyes L, Marin Gonzalez G, Enriquez Habib F, et al. Utilización de plasma rico en plaquetas para regeneración periodontal en un perro. *Rev Odont Mex.* 2004; 8: 64-69.

Moro G, Casini V, Bastieri A. Use of platelet-rich plasma in major maxillary sinus augmentation. *Minerva Stomatol.* 2003; 52: 267-71 (abstract).

Movat HZ. *The inflammatory reaction.* Amsterdam: Elsevier; 1985.

Muhlemann H.R. Die physiologische und Pthalogische Zahnbeweglichkeit. Schweiz Mschr Zahnheilk 1951; 61: 1-6.

Müller M, Hennig FF, Hothorn T, Stangl R. Bone-implant interface shear modulus and ultimate stress in a transcortical rabbit model of open-pore Ti6Al4V implants. J Biomech. 1994; 16: 645-662.

Mundy GR. Bone resorbing cells. In: Favus MJ, ed. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press; 1993. p. 25-32.

Mundy GR. Factores locales en el control de la reabsorción y formación de hueso. En: Cannata J, ed. Actualizaciones en metabolismo óseo. Madrid: Jarpyo editores; 1992. p. 41-6.

Munkelt A, Schubert R, Waschke K, Falck P, Schade R. Ausgewahlte Methoden zur Erfassung der inflammatorischen und zytotoxisten Wirkung von biokeramiken-ein beitrag zum Histokompatibilitats-Screening potentieller implantationsmaterialien. Zhan Mund Kieferheilk. 1985; 73: 814-821.

Ney T. Die vertikale Beweglichkeit des Tubinger Implantates in vergleich zum naturlichen. Zahn Z Zahnartl Implantol. 1986; 2: 17-25.

Ney T. Zur kinematik von implantate und naturlichen Zahnen. Dtsch Zahnarztl Z. 1987; 42: 1039-1044.

Nguyen H Q, Deporter D A, Pilliar R M, Valiquette N, Yakubovich R. The effect of sol-gel-formed calcium phosphate coatings on bone ingrowth and osteoconductivity of porous-surfaced Ti alloy implants. Biomater. 2004; 25: 865-876.

Oakley RME, Wright JE. Postoperative mediastinitis classification and management. Ann Thorac Surg. 1999; 11: 1030-1036.

Okuda K, Kawase T, Mornose M, Murata M, Saito Y. et al. Platelet rich plasma contains high levels of platelet derived growth factors and transforming growth factors beta and modulates the proliferation of periodontal related cells in vitro. J Periodontol 2003; 74: 849-857.

Osborn JE. Implantatwerkstoff Hydroxylapatitkeramyl. Grundlagen und klinische Anwendung. Berlin: Quintessenz; 1985.

Owen TA, Aronow MA, Shalhoub V, Barone LM, Wilming M, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol. 1963; 143: 420-430.

Palman C, Bowen Pope DF, Brooks JJ. Platelet derived growth factor receptor (B subunit) immunoreactivity in soft tissue tumors. Lab Invest. 1992; 66: 108-115.

Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. J Cell Biochem. 1994; 55: 273-286.

Parfitt AM. The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. In: Recker R, ed. Bone histomorphometry: Techniques and interpretation. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc; 1983. p. 143-223.

Pérez Del Palomar A, Arruga A, Cegoñino J, Doblare M. A finite element comparison between the mechanical behaviour of rigid and resilient oral implants with respect to immediate loading. Computer Methods Biomech Biomed Engineering. 2005; 8: 45-57.

Pérez MA, Calvo F, Prozy C, Arruga A, Bea J, Doblare M. Diseño de una nueva familia de implantes dentales mediante el uso de modelos numéricos de remodelación ósea y osteointegración. Validación experimental 2006-2009. Proyecto CICYT, DPI 2006-14669.

Pfeilschifter J, Laukhuf F, Müller-Beckman B, Blum WF, Pfister T, Ziegler R. Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta 1 in rat bone. *J Clin Invest.* 1995; 96: 767-774.

Piattelli A, Corigliano M, Scarano A, Costigliola G, Paolantonio M. Immediate loading of titanium-sprayed implants: an histologic analysis in monkeys. *J Periodontol.* 1998; 69: 321-7.

Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A. Platelet derived growth factor (BB homodimer) transforming growth factor beta -1, and basic fibroblastic growth factors in dermal wound healing: neovassel and matriz formation and cessation of repair. *Am J Pathol.* 1992; 140: 1375-1388.

Pollack M. Insuline-like growth factor physiology and cancer risk. *Eur J Cancer.* 2000; 36: 1224-1228.

Praemer AF. Musculoskeletal conditions in the United States. 2<sup>nd</sup> ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1999.

Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparations: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 966-972.

Puleo DA, Nancy A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomater.* 1999; 20: 2311-2321.

Puzas JE. The Osteoblast. In: Favus MJ, ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press; 1993. p. 15-20.

Qu K, Ortoleva P. Understanding stem cell defferentiation through self-organization theory. *J Theor Biol.* 2007; 250: 606-620.

Rattis F, Voermans C, Reya T. Wnt signaling in the stem cell niche. *Curr Opin Hematol.* 2004; 11: 88-94.

Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. B.O.E. num. 67 de 18 de marzo de 1988. p. 8509-12.

Reuling N, ed. *Biokompatibilität dentaler Legierungen. Toxikologische, histopathologische und analytische Aspekte.* Munich: Hanser; 1992.

Richter EJ, ed. *Die Verbundbrücke zwischen Zahn und Implantat: Ergebnisse experimenteller und klinischer Untersuchungen.* Aachen: Habil; 1992.

Ridderstolpe L, Gill H, Grandfeldt H, et al. Superficial and deep sternal wound complications: incidence, risk factor and mortality. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001; 20: 1168-1175.

Rigdon RH. Tissue reaction to foreign materials. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1975; 7: 425-476.

Roberts WE, Smith RK, Zilberman Y, Mozsary PG, Smith RS. Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. *Am J Orthop.* 1984; 86: 95-111.

Roccuzzo M, Bunino M, Prioglio F. Early loading of sandblasted and acid etched (SLA) implants a prospective split-mouth comparative study. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12: 572-8.

Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone.* 1992; Suppl 1: 3-6.

Rodríguez VM, Cuéllar A, Cuspoca LM, Contreras CL, Mercado M, Gómez A. Determinación fenotípica de subpoblaciones de células madre derivadas de sangre de cordón umbilical. *Biomedica* 2006; 26: 51-60.

Roeder I, Glauche I. Towards an understanding of lineage specification in hematopoietic stem cell: a mathematical model for the interaction of transcription factors GATA-1 and PU1. *J Theor Biol.* 2006; 241: 852-865.

Roldán JC, Jepsen S, Schmidt C, Knüppel H, Rueger DC, Açil Y, Terheyden H. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15: 716-23.

Roldán JC, Knueppel H, Schmidt C, Jepsen S, Zimmermann C, Terheyden H. Single-stage sinus augmentation with cancellous iliac bone and anorganic bovine bone in the presence of platelet-rich plasma in the miniature pig. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19: 373-8.

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; 17: 44-51.

Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived Growth factor. *Cell.* 1986; 46: 155-169.

Saadoun AP, Le Gall ML. Clinical results and guidelines on Steri-Ossendosseous implants. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1992; 12: 486-95.

Sagara M, Akagawa Y, Nikai H, Tsuru H. The effects of early occlusal loading on one-stage titanium alloy implants in beagle dogs: A pilot study. *J Prosthet Dent.* 1993; 69: 281-8

Sánchez AR, Sheridan PJ, Eckert SE, Weaver AL. Regenerative potential of platelet-rich plasma added to xenogenic bone grafts in peri-implant defects: a histomorphometric analysis in dogs. *J Periodontol.* 2005; 76: 1637-44.

Sánchez AR, Eckert SE, Sheridan PJ, Weaver AL. Influence of platelet-rich plasma added to xenogeneic bone grafts on bone mineral density associated with dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005; 20: 526-32.

Sánchez-Garcés MA. Evaluación de la actividad osteoblástica en la interfase de implantes dentarios con diferentes superficies mediante gammagrafía ósea con TC99 MDF. Estudio en un modelo animal. Tesis doctoral. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2005.

Sánchez M, Azofra J, Aizpurúa B, Elorriaga R, Anitua E, Andia I. Aplicación de plasma autólogo rico en factores de crecimiento en cirugía artroscópica. *Cuad Artroscop*. 2003; 10: 12-19.

Sandrik JL, Kaminski EJ, Greener EH. Biocompatibility of nickel-based dental alloys. *Biomater Med Devices Artif Org*. 1974; 2: 31-39.

Schaaf H, Streckbein P, Lendeckel S, Heidinger K, Görtz B, Bein G, Boedeker RH, Schlegel KA, Howaldt HP. Topical use of platelet-rich plasma to influence bone volume in maxillary augmentation: a prospective randomized trial. *Vox Sang*. 2008; 94: 64-9.

Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000*. 1998; 17: 22-35.

Schnitman PA, Wohrle PS, Rubenstein JE. Immediate fixed interim prostheses supported by two-stage threaded implants: methodology and results. *J Oral Implantol*. 1990; 16: 96-105.

Schwartz MS. Complicaciones mecánicas de los implantes dentales. *Acta Dent Int*. 2001; 2: 134-137

Schwartz-Arard D, Kidron N, Doley E. A long-term study of implants supporting overdentures as a model for implant success. *J Periodontol*. 2005; 76: 1431-1435.

Selvig K. Discussion: Animal, models in reconstructive therapy. *J Periodontol.* 1994; 65: 1169-72.

Sennerby L, Miyamoto I. Insertion torque and RFA analysis of TiUnite and SLA implants. A study in the rabbit. *Applied Osseoint Res.* 2000; 1: 31-3.

Sennerby L, Thomsen P, Ericson L. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992; 7: 62-71.

Sennerby L, Thomsen P, Ericson L. Early bone tissue responses to titanium Implants inserted in rabbit cortical bone. *J Mater Sci Mater Med.* 1993; 4: 240-50.

Sennerby L, Ericson LE, Thomsen P, Lekholm U, Astrand P. Structure of the bone-titanium interface in retrieved clinical oral implants. *Clin Oral Implant Res.* 1991; 2: 130-111.

Sennerby L. On the bone tissue response to titanium implants. [Thesis]. Goteborg: University of Goteborg; 1991.

Serrano S, Mariñoso ML. Bases histológicas de la histomorfometría ósea. En: Serrano S, Aubia J, Mariñoso ML, eds. *Patología Osea Metabólica.* Barcelona: Doyma; 1990. p. 55-70.

Sharp RE. The relationship of the pulp and periodontium. *J West Soc Periodontol.* 1977; 25: 130-142

Simonpieri A, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. The relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. Part II: implant surgery, prosthodontics, and survival. *Implant Dent.* 2009; 18: 220-9.

Slater M, Patava J, Kinghan K, Mason S. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res.* 1995; 13: 655-63.

Soballe K, Brockstedt-Rasmussen H, Hansen ES, Bünger C. Hydroxiapatite coating modifies implant membrane formation. *Acta Orthop Scand.* 1992; 63: 128-140.

Soballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Bünger C. Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants. *J Bone Joint Surg.* 1993; 75-B: 270-278.

Soballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Jorgensen PH, Bünger C. Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatite-coated implants during stable and unstable mechanical conditions. *J Orthop Res.* 1992; 10: 285-299.

Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J.* 2001; 10: S86-S95.

Spears I R, Pfliegerer M, Schneider E, Hille E, Morlock M M. The effect of interfacial parameters on cup-bone relative micromotions. A finite element investigation. *J Biomech.* 2001; 34: 113-120

Spector M, Cease C, Tong-Li X. The local tissue response to biomaterials. *Crit Revue Biocomp.* 1989; 5: 269-95.

Stedd DL. Clinical evaluation of recombinant platelet- derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcer. *J Vasc Surg.* 1995; 21: 132-135.

Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev.* 1993; 14: 424-442.

Steinmann S. Werkstoff titan. In: Schroeder A, Sutter F, Krekeler G, eds. *Orale Implantologie.* Stuttgart: Thieme; 1998.

Sul YT, Johansson C, Albrektson T. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002; 17: 625-34.

Sutherland HJ, Eaves, AC, Eaves CJ. Quantitative assays of human hemopoietic progenitor cells. In: De Gee AP, ed. Bone Marrow Processing and Purging: A Practical Guide. Boca Raton: CRC Press Inc; 1991. p. 155-171.

Swennen GRJ, Schutyser F, Mueller MC, Kramer FJ, Eulzer E, Schliephake H. Effects of platelet-rich plasma on cranial distraction osteogenesis in sheep: preliminary clinical and radiographic results. *Int Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34: 294-304.

Szmukler-Moncler S, Piatelli A, Favero GA, Dubruille JH. Considerations preliminary to the application of early and immediate loading protocols in dental implantology. *Clinical Oral Implants Res.* 2000; 11: 12-25.

Szmukler-Moncler S. Time of loading and effect of micromotion on bone dental implant interface: Review of experimental literature. *J Biomed Mater Res.* 1998; 43: 192-203.

Szmukler-Moncler S, Salama H, Reingewirtz Y, Dubruille 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

Tabata Y. Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng.* 2003; 9: 505-515.

Tarnow DP, Emtiaz Sh, Classi A. Immediate Loading of Threaded Implants at Stage 1 Surgery in Edentulous Arches: Ten Consecutive Case Reports With 1- to 5-Year Data *Int J Oral Maxillofac Implant.* 1997; 12: 319-324.

Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo -Dias LL. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994; 52: 161-6.

Teitelbaum JD. Molecular defects of Bone Development. In: Favus MJ, ed. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press; 1993. p. 10-14.

Terminé JD. Bone Matrix Proteins and Mineralization Process. En: Favus MJ. ed. primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press; 1993. p. 21-24.

Testori T, Szmukler-Moncler S, Francetti L, et al. Immediate loading of Osseotite implants: a case report and histologic analysis after 4 month of occlusal loading. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001; 21:451-9.

Tetsch P, ed. Enossale Implantationen in der Zahnheilkunde. Munchen: Carl Hander Verlag; 1991.

Thor A, Wannfors K, Sennerby L, Rasmusson L. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with autogenous bone, platelet-rich plasma, and implants: 1-year results of a controlled prospective 5-year study. *Clin Implant Dent Res.* 2005; 7: 209-20.

Torres J, Tamimi F, Martinez PP, Alkhraisat MH, Linares R, Hernández G, Torres-Macho J, López-Cabarcos E. Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009; 36: 677-87.

Vigorita VJ, ed. Orthopaedic Pathology. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2008.

Wang X, Willenbring H, Akkari I, et al. Cell fusion is the principal source bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature.* 2003; 422: 897-901.

Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Ruther U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature.* 1992; 360: 741-745.

Watanabe W, Niimi A, Ueda M. Autogenous bone graft in the rabbit maxillary sinus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 88: 26-32.

Watson P, Lazowski D, Han V, Fraher L, Steer B, Hodsman. Parathyroid hormone restores bone mass and enhances osteoblast insulin-like growth factor I gene expression in ovariectomized rats. *Bone.* 1995; 16: 357-365.

Weinstein M, Klawitter JJ, Anand SC, Schuessler R. Stress analysis of porous rooted dental implants. *J Dent Res.* 1976; 55: 772-777.

Weinlaender M, Kenney EB, Lekobic V, et al. Histomorphometry of bone apposition around three types of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992; 7: 491-496.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83: 835-870.

Whitman DH, Berry R, Green D. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55: 1294-9.

Williams DF. The properties and medical uses of material. Part III: The reactions of tissues to materials. *Biomed Eng.* 1971; 6: 152-156.

Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 1999; 82: 241-250.

Yilmaz S, Cakar G, Kuru BE, Yildirim B. Platelet-rich plasma in combination with bovine derived xenograft in the treatment of generalized aggressive periodontitis: a case report with re-entry. *Platelets.* 2007; 18: 535-9.

You TM, Choi BH, Li J, Jung JH, Lee HJ, Lee SH, Jeong SM. The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated with Bio-

Oss: a pilot study in the dog tibia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103: 8-12.

You TM, Choi BH, Zhu SJ, Jung JH, Lee SH, Huh JY, Lee HJ, Li J. Treatment of experimental peri-implantitis using autogenous bone grafts and platelet-enriched fibrin glue in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103: 34-7.

Yu H, Yuan Y, Shen H, Cheng T. Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18 INK4C AND p21 Cip1/ Waf1 in opposite manners. *Blood.* 2006; 107: 1200-1206.

Zubery Y, Bichacho N, Moses O, Tal H. Immediate loading of modular transitional implants: a histologic and histomorphometric study in dogs. *Int J Periodont Rest Dent.* 1999; 19: 343-53.

ANEXOS

## ANEXO I.

**Carta de conformidad del Comité Ético**

SERVICIO DE BIOMEDICINA Y BIOMATERIALES  
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
FACULTAD DE MEDICINA  
50009 ZARAGOZA

REGISTRO DE SALIDA  
Fecha 17/09/04 Nº 17

Zaragoza, 17 de Septiembre del 2004

Revisada la información complementaria presentada al Comité Ético del Centro de Servicios y Laboratorios de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Zaragoza, para los procedimientos que utilizan animales de experimentación, esta Comisión

INFORMA:

Que el procedimiento empleado en el Proyecto de Investigación:

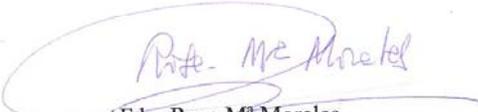
**“Evaluación de la adherencia de células mononucleares a implantes de Ti resilientes sistema Intri. Estudio in Vitro y en modelo experimental”**

**presentado por Dr. Alberto Arruga Artal**

Cumple los principios éticos fundamentales y la legislación vigente en materia de protección de los animales de experimentación (RD 223/1988, BOE 18-3-88) así como los requisitos de la Ley 11 / 2003 de Protección Animal en la C.A. de Aragón.

Se desarrollara en el Servicio de Biomedicina y Biomateriales de la Universidad de Zaragoza, que se encuentra registrado como “Centro de cría, suministrador y usuario”(O.13-10-89, BOE 18-10-89), en la Diputación General de Aragón con el nº: 50297-18 A.

Por todo ello y solo para el procedimiento revisado se informa : **FAVORABLEMENTE.**

  
Fdo: Rosa M<sup>a</sup> Morales  
Veterinaria colegiada nº 341  
Presidenta del Comité Ético

## ANEXO II.

**Acreditación de homologación para el ejercicio profesional en centros de experimentación animal con fines científicos**

**VISTA** la solicitud presentada por D.(o D<sup>a</sup>) ALBERTO ARRUGA ARTAL, con D.N.I 17.178.304H, sobre homologación de la formación para el ejercicio profesional en centros de experimentación animal y otros fines científicos.

**ANTECEDENTES DE HECHO**

**Primero.**- Con fecha 10/04/06 tuvo entrada en el Registro General del Gobierno de Aragón la solicitud antes indicada dentro del plazo establecido en el punto 2 del apartado Segundo de la Orden de 20 de abril de 2006, del Departamento de Agricultura y Alimentación, por la que se convoca el proceso de homologación para el ejercicio profesional en los centros de experimentación animal y otros fines científicos.

En el citado escrito se solicita la homologación de la formación para la categoría profesional B (personal que lleva a cabo los procedimientos) y C (personal responsable para dirigir o diseñar los procedimientos), *aportando para ello la documentación requerida en los puntos 4, 5 y 6 del apartado Tercero de la precitada Orden así como la indicada en su Anexo II.*

**Segundo.**- En fecha 17 de julio de 2006, la Comisión de Valoración prevista en el apartado Tercero de la Orden de 20 de abril de 2006 concluyó con el proceso de evaluación de las solicitudes presentadas de homologación de la formación para el ejercicio profesional en centros de experimentación animal y otros fines científicos, levantando acta de aquella, conforme prevé el apartado Cuarto de la precitada Orden.

En dicha Acta consta la valoración de cada solicitante en relación con el cumplimiento de los requisitos establecidos en el Real Decreto 1021/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y en la Orden de 20 de abril de 2006, indicándose respecto a D.(o D<sup>a</sup>) ALBERTO ARRUGA ARTAL que procede la homologación de su formación por cumplir con los citados requisitos.

**VISTAS** la Orden de 20 de abril de 2006, del Departamento de Agricultura y Alimentación, por la que se convoca el proceso de homologación para el ejercicio profesional en los centros de experimentación animal y otros fines científicos; el Real Decreto 1021/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos; el Decreto 302/2003, de 2 de diciembre, del Gobierno de Aragón, por el que se aprueba la estructura orgánica del Departamento de Agricultura y Alimentación; la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común; la Ley del Presidente y Gobierno de Aragón y la Ley de la Administración de la Comunidad Autónoma de Aragón, cuyos Textos Refundidos se aprueban por los Decretos Legislativos 1/2001 y 2/2001, de 3 de julio, del Gobierno de Aragón, respectivamente; y demás normativa aplicable.

**VISTA** también el Acta levantada por la Comisión de Valoración.

**FUNDAMENTOS DE DERECHO**

**Primero.**- La Directora General de Alimentación es el órgano competente para resolver la presente solicitud, de acuerdo con lo previsto en el apartado Quinto de la Orden de 20 de abril de 2006.

**Segundo.**- Según el punto 2 del apartado Quinto de la precitada Orden los acuerdos de la Comisión de Valoración serán vinculantes para el órgano competente para resolver, debiendo resolver estimatoriamente únicamente aquellas solicitudes que hayan sido consideradas procedentes por aquella.

Por lo expuesto **RESUELVO**

**Estimar** la solicitud presentada por D.(o D<sup>a</sup>) ALBERTO ARRUGA ARTAL, con D.N.I 17.178.304H concediéndole la homologación de la formación para el ejercicio profesional en los centros de experimentación animal y otros fines científicos en la categoría profesional B (personal que lleva a cabo los procedimientos) y C (personal responsable para dirigir o diseñar los procedimientos).

Contra la presente Resolución que no agota la vía administrativa, cabe interponer recurso de alzada ante el Excmo. Sr. Consejero de Agricultura y Alimentación, en el plazo de un mes contado a partir del día siguiente a aquel en que tenga lugar la notificación o publicación de la presente Resolución, sin perjuicio de cualquier otro recurso que se estime procedente.

En Zaragoza, a 4 de septiembre de 2006

LA DIRECTORA GENERAL DE ALIMENTACION  
p.s. EL SECRETARIO GENERAL TECNICO DE AGRICULTURA Y ALIMENTACION  
(Orden 23-12-2003)

José Antonio Guzmán Córdoba

PATENTES

## PATENTE I.

## PATENTE ES2211276A1

## Método de obtención de la capa leucoplaquetar, su gel y aplicaciones

①9

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 211 276**

②1 Número de solicitud: 200200816

⑤1 Int. Cl. 7: **A61C 8/00**  
C12N 3/00

①2

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **09.04.2002**④3 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2004**④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.07.2004**⑦1 Solicitante/s: **Alberto Arruga Artal**  
**Monasterio de Samos nº 15 - 1ªA**  
**50008 Zaragoza, ES**  
**Carlos Arruga Artal**⑦2 Inventor/es: **Arruga Artal, Alberto**⑦4 Agente: **Ungría López, Javier**⑤4 Título: **Método de obtención de la capa leucoplaquetar, su gel y aplicaciones.**

⑤7 Resumen:

Método de obtención de la capa leucoplaquetar, su gel y aplicaciones.

Método de obtención de la capa leucoplaquetar, su gel y aplicaciones, partiendo de una extracción de sangre periférica, preferentemente, de la flexura del codo, en principio se obtiene la capa leucoplaquetar, partir de la cual se obtendrá su gel, comprendiendo el método de obtención una centrifugación diferencial de la sangre a unas revoluciones de 150 a 400 g, durante 10 a 30 minutos, extrayendo, posteriormente, la capa relativa al plasma pobre en plaquetas y al plasma rico en plaquetas (P. R. P.), correspondientes a la capa leucoplaquetar, pudiendo coger una parte de glóbulos rojos, aproximadamente, 0,5 ml., añadiendo a la misma un medio de cultivo de McCOYS con citoquinas.

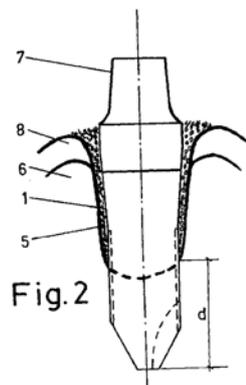


Fig. 2

ES 2 211 276 A1

1

ES 2 211 276 A1

2

**DESCRIPCIÓN**

Método de obtención de la capa leucoplaquetar, su gel y aplicaciones.

**Objeto de la invención**

La siguiente invención, según se expresa en el enunciado de la presente memoria descriptiva, se refiere a método de obtención de la capa leucoplaquetar, su gel y aplicaciones, de forma que la capa leucoplaquetar es obtenida a partir de una extracción de sangre periférica, preferentemente, de una vena de la flexura del codo.

Así, la capa leucoplaquetar obtenida tiene por objeto su utilización, principalmente, en traumatología, en cirugía ortognática y en implantología, de forma que en implantología al estar en contacto con el elemento a implantar se produce un crecimiento celular, consiguiendo una mejor calidad de hueso y acortar el tiempo de recuperación.

Por otra parte, el gel obtenido a partir de la capa leucoplaquetar, es de utilidad en cirugía reparadora, en traumatología, en cirugía ortognática, en implantología, y en odontología, pudiendo ser empleado, bien como único elemento o en combinación con otros.

**Campo de aplicación**

La capa leucoplaquetar, es de especial aplicación en implantología, al actuar de baño para la inmersión del correspondiente elemento a implantar, incubándose durante un tiempo determinado a una temperatura constante, para su adhesión al elemento a implantar.

El gel de la capa leucoplaquetar, es de especial aplicación como elemento de relleno, bien como único elemento a colocar o en combinación con otros.

**Antecedentes de la invención**

Convencionalmente, para la obtención de plasma rico en plaquetas, en primer lugar, la sangre obtenida por una extracción de sangre periférica, preferentemente, de la flexura del codo es centrifugada a 5.600 rev/min., separándose sus tres componentes, de forma que se desecha la capa pobre en plaquetas, y el resto se vuelve a centrifugar a 2.400 rev/min. para conseguir la separación precisa de la capa de plasma rico en plaquetas (P. R. P.) y los glóbulos rojos, siendo a partir de ella de la que se obtendrá el gel, como más adelante veremos.

En cuanto al gel, en primer lugar, podemos indicar que el mismo se trata de un compuesto derivado del plasma rico en plaquetas, en un estado semisólido o de consistencia semisólida, a modo de coágulo, siendo utilizado como elemento de relleno en traumatología y en odontología.

Así, dicho gel, en odontología, se utilizará como elemento de relleno tras extracciones dentales, rellenando el alvéolo o alvéolos de las raíces, dejando un campo mejor preparado, bien para recibir implantes o bien para eliminar la cirugía preprotésica.

Elo es como consecuencia de que tras las extracciones dentales se produce una reabsorción provocando unos cráteres o irregularidades, y con ello que la dentadura postiza quede mal asentada, precisando en ocasiones cirugía preprotésica.

Convencionalmente, para la obtención del gel de plasma rico en plaquetas, a partir de la obtención de la misma, se requiere iniciar el proceso de coagulación con una mezcla de 10 ml. de cloruro cálcico al 10% con trombina bovina tópica de 10.000 unidades, requiriendo utilizar jeringas individuales para cada mezcla que contiene del orden de 6 ml. de plasma

rico en plaquetas (P. R. P.), 1 ml. de la mezcla de cloruro cálcico y trombina y 1 ml. de aire para completar el proceso.

Finalmente, la jeringa se agita durante 6-10 segundos para homogeneizar el producto, que, ya en forma de gel, se puede utilizar del modo deseado.

Por otra parte, para complementar la descripción que seguidamente se va a realizar, y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña a la presente memoria descriptiva, de un juego de planos, en cuyas figuras de forma ilustrativa y no limitativa, se representan, a modo de ejemplo, la aplicación de gel de células mononucleares en odontología.

**Breve descripción de los diseños**

Figura 1. Muestra un implante contenido en un vial a cuyo implante se ha adherido gel de células mononucleares.

Figura 2. Muestra una vista en alzado lateral del posicionamiento del implante de la figura anterior en un alvéolo, pudiendo observar como el gel se distribuye por la superficie exterior de dicho implante.

**Descripción detallada de la invención**

En la presente memoria se describe un método de obtención de la capa leucoplaquetar, su gel y aplicaciones, de manera que partiendo de una extracción de sangre periférica, preferentemente, de la flexura del codo, en principio se obtiene la capa leucoplaquetar, a partir de la cual se obtendrá su gel, de forma que el método de obtención comprende una centrifugación diferencial de la sangre a unas revoluciones de 150 a 400 g. durante 10 a 30 minutos, extrayendo, posteriormente, la capa relativa al plasma pobre en plaquetas y al plasma rico en plaquetas (P. R. P.), correspondientes a la capa leucoplaquetar, pudiendo coger una parte de glóbulos rojos, aproximadamente, 0,5 ml., añadiendo a la misma un medio de cultivo de McCOYS con citoquinas.

Por otra parte, para la obtención del gel de la capa leucoplaquetar, la citada capa leucoplaquetar, tratada con un medio de McCOYS con citoquinas, contenida en el correspondiente vial abierto o cerrado, es introducida en una estufa a 37°C durante un tiempo de 30 a 60 minutos.

Preferentemente, la capa leucoplaquetar, tratada con un medio de McCOYS con citoquinas, será mantenida en la estufa durante, aproximadamente, 30 minutos.

La capa leucoplaquetar, tratada con un medio de McCOYS con citoquinas, es de uso en implantología como baño de inmersión para elementos a implantar, incubándose durante un tiempo, de 30 a 60 minutos, a una temperatura constante de 37°C., quedando el elemento a implantar preparado para su implantación.

Así, el elemento a implantar puede ser de titanio u otro material metálico, como puede ser acero inoxidable, de forma que en contacto con la capa leucoplaquetar se produce una adherencia de células al elemento a implantar.

De esta forma, es de aplicación en todo tipo de intervenciones en las cuales sea preciso la implantación de algún elemento, como puede ser tornillos, vástagos, placas, prótesis (cadera, rodilla, etc.), dado que se obtiene un crecimiento celular, consiguiendo una mejor calidad del hueso y un acortamiento en el tiempo de recuperación.

Por otra parte, el gel obtenido a partir de la capa leucoplaquetar, tratada con un medio de McCOYS

3

ES 2 211 276 A1

4

con citoquinas, es de uso en cirugía reparadora, en traumatología, en cirugía ortognática y otras especialidades, como elemento independiente o en combinación con otros elementos.

Así, puede ser utilizado en combinación de malla de titanio para la reconstrucción de zonas tales como los maxilares.

Igualmente, el gel obtenido a partir de la capa leucoplaquetar es de uso en odontología como elemento de relleno de forma independiente o en combinación con otros elementos.

De esta forma, puede ser utilizado como elemento de relleno independiente en extracciones dentales, rellenando el alvéolo o alvéolos de las raíces, dejando un campo mejor preparado, bien para recibir implantes o bien para eliminar la cirugía preprotésica como consecuencia de los "cráteres" irregulares que se forman por las extracciones, y que como consecuencia de los mismos la dentadura queda mal asentada.

Asimismo, puede utilizarse en combinación con otros materiales de relleno, como puede ser hueso demineralizado, hueso natural, injerto de hueso del propio paciente extraído de las zonas convencionales, hueso de banco, es decir, banco de hueso utilizado en traumatología.

Preferentemente, la citoquina es L-Glutamina.

*Ejemplo de uso de la capa leucoplaquetar y su gel en odontología*

Una vez realizada una extracción de sangre periférica se obtiene la capa leucoplaquetar por centrifugación diferencial, en un tiempo aproximado de 10 a 30 minutos, siendo tratada con un medio de McCOYS con citoquinas, procediéndose a su introducción en un vial que contiene un implante dental, para ser introducido en una estufa a una temperatura de 37°C., obteniendo de esta forma un implante dental recubierto de una capa leucoplaquetar en forma de gel, mediante el cual podremos remodelar un alvéolo de una reciente extracción por fractura radicular.

Así, debido a la forma general tronco-cónica de

los alvéolos uniradiculares conseguiremos, a la vez que se va roscando el implante que la capa leucoplaquetar rellene aquellas zonas alveolares alejadas de la geometría del propio implante, consiguiendo una mejor adaptación del hueso al implante.

En los diseños adjuntos se observa como el implante dental 1 está colocado en el vial 2, quedando unido a su tapa 3 a través de un cuerpo intermedio 4, de forma que al implante 1 se ha fijado gel 5 de la capa leucoplaquetar tratada con un medio de McCOYS y L-Glutamina, estando dicho implante 1 preparado para su implantación.

Así, el implante 1 se dispone en el correspondiente alvéolo, roscándose al hueso 6 en relación a su extremo, en tanto que el gel 5 adherido a él se distribuye por su superficie rellenando la oquedad alveolar.

De esta forma, el gel se dispersa hasta la mucosa 8 quedando libre la pieza 7 portadora de la prótesis dental, de manera que aunque el implante 1 sólo quede roscado en el hueso la distancia "d" el gel favorece su fijación.

*Ejemplo de uso de la capa leucoplaquetar en cirugía reparadora maxilo-facial con malla de titanio*

Para la reconstrucción ósea de la cara en los casos que se haya tenido que eliminar hueso como consecuencia de un tumor, hemimandibulectomía, (cirugía maxilo-facial), para poder realizar una reconstrucción (plastia reparadora), una vez accedido al hueso, separación planos musculares, se fija una o más mallas de titanio flexible, mediante unos tornillos, rellenando el hueco con un material de relleno compuesto por hueso autólogo, hueso demineralizado bovino, hueso de banco de trauma o combinación de ellos con gel.

Así, sobre la malla se podrá colocar posteriormente uno o varios implantes incubados, asimismo, los implantes incubados podrán ser colocados directamente en la malla de titanio con el relleno quedando preparado para la colocación de la correspondiente prótesis.

45

50

55

60

65

5

ES 2 211 276 A1

6

**REIVINDICACIONES**

1. Método de obtención de la capa leucoplaquetar y su gel, partiendo de una extracción de sangre periférica, preferentemente, de la flexura del codo, en principio se obtiene la capa leucoplaquetar, partir de la cual se obtendrá su gel, **caracterizado** porque el método de obtención comprende una centrifugación diferencial de la sangre a unas revoluciones de 150 a 400 g. durante 10 a 30 minutos, extrayendo, posteriormente, la capa relativa al plasma pobre en plaquetas y al plasma rico en plaquetas (P. R. P.), correspondientes a la capa leucoplaquetar, pudiendo coger una parte de glóbulos rojos, aproximadamente, 0,5 ml., añadiendo a la misma un medio de cultivo de McCOYS con citoquinas.

2. Método de obtención de la capa leucoplaquetar y su gel, según reivindicación 1ª, **caracterizado** porque el gel de la capa leucoplaquetar se obtiene introduciendo la capa leucoplaquetar, tratada con un medio de McCOYS y citoquinas, en una estufa a 37° C durante un tiempo de 30 a 60 minutos.

3. Método de obtención de la capa leucoplaquetar y su gel, según reivindicación 2ª, **caracterizado** porque, preferentemente, la capa leucoplaquetar, tratada con un medio de McCOYS y citoquinas, será mantenida en la estufa, aproximadamente, durante 30 minutos.

4. Método de obtención de la capa leucoplaquetar y su gel, según reivindicación 2ª, **caracterizado** porque la citoquina es L-Glutamina.

5. Uso de la capa leucoplaquetar de la reivindicación 1ª, en implantología como baño de inmersión para elementos a implantar, incubándose durante, aproximadamente, un tiempo de 30 minutos, a una temperatura constante de 37° C.

6. Uso del gel de las reivindicaciones 2ª y 3ª, en cirugía ortognática, cirugía reparadora, traumatología y otras especialidades, como elemento independiente o en combinación con otros elementos.

7. Uso del gel de las reivindicaciones 2ª y 3ª, en odontología como elemento de relleno de forma independiente o en combinación con otros elementos.

25

30

35

40

45

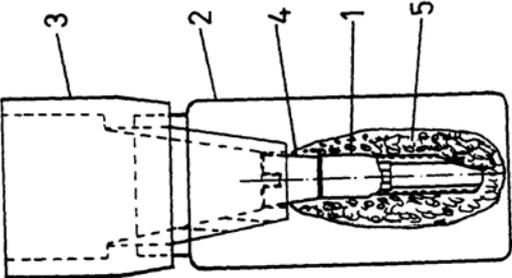
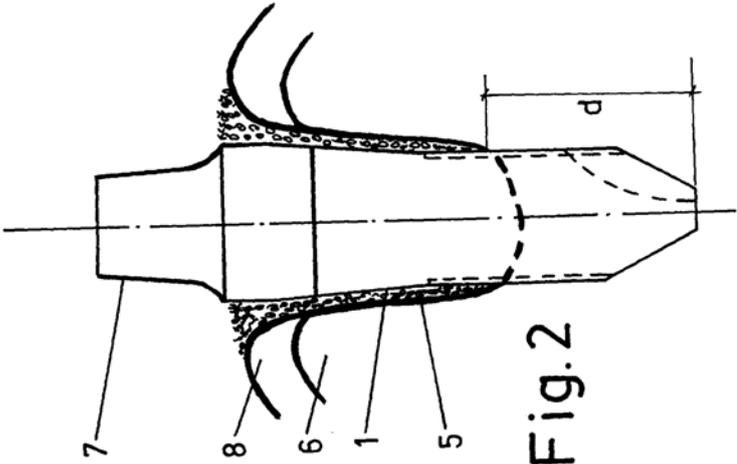
50

55

60

65

ES 2 211 276 A1





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 211 276

②1 N° de solicitud: 200200816

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 09.04.2002

②3 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤1 Int. Cl.7: A61C 8/00, C12M 3/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9821334 A (MORPHOGENESIS INC.) 22.05.1998	
A	US 5944524 A (FRANK HILL et al.)	
<p><b>Categoría de los documentos citados</b></p> <p>X: de particular relevancia            Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría            A: refleja el estado de la técnica</p> <p>O: referido a divulgación no escrita            P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud            E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud</p>		
<p><b>El presente informe ha sido realizado</b></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones      <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:</p>		
<p><b>Fecha de realización del informe</b> 27.05.2004</p>	<p><b>Examinador</b> M. Ybarra Fernández</p>	<p>Página 1/1</p>

PATENTE II.

**PATENTE ES2222099A1**

**Procedimiento de obtención de células mononucleares**



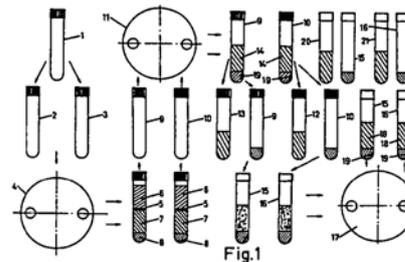
⑪ Número de publicación: **2 222 099**  
 ⑫ Número de solicitud: 200301596  
 ⑬ Int. Cl.?: **C12N 5/08**  
**A61C 8/00**

⑭ SOLICITUD DE PATENTE A1

<p>⑮ Fecha de presentación: <b>09.07.2003</b></p> <p>⑯ Fecha de publicación de la solicitud: <b>16.01.2005</b></p> <p>⑰ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: <b>16.01.2005</b></p>	<p>⑱ Solicitante/s: <b>Alberto Arruga Artal</b>  <b>Monasterio de Samos, 15 1ª A</b>  <b>50008 Zaragoza, ES</b></p> <p>⑲ Inventor/es: <b>Arruga Artal, Alberto</b></p> <p>⑳ Agente: <b>Ungría López, Javier</b></p>
---	---

㉑ Título: **Procedimiento de obtención de células mononucleares.**

㉒ Resumen:  
 Procedimiento de obtención de células mononucleares. Procedimiento de obtención de células mononucleares, partiendo de una extracción de sangre periférica, mediante sistema vacutainer® comprendiendo el procedimiento diferentes fases, realizándose dos extracciones del vacutainer®, a inyectar en respectivos viales (2) y (3) con un separador celular; una centrifugación de dichos viales (2) y (3); una aspiración de la capa de células mononucleares (5) para inyectarlas en viales (9) y (10) con un medio de cultivo; una centrifugación de ambos viales (9) y (10); una aspiración de parte (14) de su contenido, mientras que los últimos ml., conteniendo las células mononucleares (19), se agitan y se inyectan en respectivos viales (15) y (16), con un medio de cultivo; una nueva centrifugación; una nueva aspiración de parte (18) de su contenido, mientras que los últimos ml., conteniendo las células mononucleares (19), se agitan y se inyectan en un vial contenedor del elemento a implantar.



ES 2 222 099 A1

ES 2 222 099 A1

1

2

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento de obtención de células mononucleares.

**Objeto de la invención**

La siguiente invención, según se expresa en el enunciado de la presente memoria descriptiva, se refiere a procedimiento de obtención de células mononucleares, siendo llevado a cabo a partir de una extracción de sangre periférica, preferentemente, de la flexura del codo del propio paciente, con objeto de obtener en pequeñas clínicas la separación y crecimiento posterior de las células mononucleares de una forma rápida y operativa, sin precisar laboratorios especializados y pudiendo realizarse en el momento en el que se va a realizar la operación de implantación de carácter ambulatorio sin necesidad de ingreso en centros hospitalarios.

Así, las células mononucleares serán utilizadas como baño de inmersión de un elemento de implante, tal como un implante dental, de forma que el procedimiento de obtención puede ser llevado a cabo sin precisar un laboratorio estéril de cultivo, por lo que es de especial aplicación, para ser utilizado con carácter ambulatorio y en salas de consulta.

De esta forma, el procedimiento de obtención de células mononucleares que se presenta tiene por objeto la obtención de células mononucleares a partir de una extracción de sangre periférica, preferentemente de la flexura del codo, pudiendo ser llevado a cabo en consultas médicas, tales como las odontológicas, permitiendo, durante el propio tiempo de consulta para efectuar el implante dental, haber mantenido el cuerpo de implante inmerso en un baño de células mononucleares del propio paciente, presentando la ventaja de minimizar el riesgo de rechazo, así como permitiendo que el paciente se vaya con el implante colocado.

**Campo de aplicación**

En la presente memoria se describe un procedimiento de obtención de células mononucleares, cuyo procedimiento es de especial aplicación para su puesta en práctica en pequeñas clínicas al poder ser llevado a cabo sin necesidad de disponer de un laboratorio de cultivo y en un ambiente no estéril y eliminando la campana de flujo laminar.

**Antecedentes de la invención**

Como es conocido en hematología a partir de una extracción sanguínea, preferentemente periférica, en grandes centros hospitalarios o laboratorios especializados, se pueden obtener células mononucleares, mediante un adecuado tratamiento y requiriendo tiempo y aceleradores de crecimiento, para su utilización en operaciones quirúrgicas a realizar al propio paciente con posterioridad, siendo de especial utilidad en implantología, al conseguir un aumento de estas células.

Por otra parte, en todas las especialidades médicas, y en general en todas las industrias, se ha producido un gran avance técnico, de manera que en especialidades médicas, tales como en odontología, se trata de evitar, en lo posible, las habituales, en tiempos, extracciones de las piezas dentales, tratando de mantener, siempre que sea posible, las piezas naturales.

Lógicamente, a pesar de ello, en numerosas ocasiones se hace preciso la extracción de piezas dentales, siendo cada día más habitual sustituirlas por implantes fijos, en lugar de por puentes provisionales o

permanentes, consistentes en elementos de una o más piezas dentales artificiales fijados a un soporte que se sostiene en las piezas dentales naturales contiguas, de forma que, ante la carencia de un número importante de piezas dentales su sustitución se lleva a cabo por medio de una dentadura postiza parcial, e incluso total, ante la carencia total de piezas dentales naturales.

De esta forma, la implantología dental ha experimentado un importante avance, y, entre otros objetivos, se trata de evitar los rechaces del cuerpo de implante, de manera que si el cuerpo de implante es sometido a un baño de células mononucleares del propio paciente las células se adhieren al implante minimizando el riesgo de rechazos del mismo, al poder conseguir un aumento de dichas células previamente a la implantación del implante, además de facilitar la osteointegración.

Así, uno de los principales inconvenientes que se presentan es poder llevar a cabo dicha técnica con carácter ambulatorio o sin necesidad de ingreso en un centro hospitalario.

Por otra parte, podemos citar la Patente de Invención española P200000984 por: implante dental y método operativo de implantación, en la cual se presenta un método de obtención de células mononucleares con objeto de actuar como baño de inmersión de un implante dental, de forma que el mismo se caracteriza porque una vez extraída sangre al paciente, mantenida en el correspondiente recipiente de extracción provisto de un anticoagulante, una cantidad predeterminada de la misma se vierte en un recipiente al que se añade idéntica cantidad de suero, introduciendo la mezcla obtenida en un recipiente que contiene un separador celular de densidad 1077, centrifugándose para la separación en diferentes capas de los componentes sanguíneos, extrayéndose la capa de células mononucleares obtenida para realizarle dos lavados consecutivos en medio de cultivo de McCOYS, y su posterior introducción en el recipiente contenedor del implante a implantar, incubándose durante un tiempo predeterminado a una temperatura constante de 37°C, adhiriéndose las células mononucleares al cuerpo de implante, quedando ya dispuesto para su inmediata implantación.

**Descripción de la invención**

En la presente memoria se describe un procedimiento de obtención de células mononucleares, partiendo de una extracción de sangre periférica, preferentemente, de la flexura del codo, siendo llevado a cabo mediante el sistema vacutainer® para rellenar el vacutainer® conteniendo suero fisiológico con la sangre extraída y una, posterior, extracción del aire de su interior, de forma que el procedimiento comprende las siguientes fases:

- ♦ dos sucesivas extracciones de 3 ml. del contenido del vacutainer® siendo inyectadas en respectivos viales conteniendo un separador celular;
- ♦ una centrifugación de los dos viales, uno frente al otro, a 2.000 r.p.m. durante 20 minutos;
- ♦ una aspiración de la capa de células mononucleares para ser inyectadas en correspondientes viales con un medio de cultivo;
- ♦ una centrifugación de ambos viales a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos;
- ♦ una aspiración de parte del contenido de ambos

viales y su desecho o inyección en correspondientes viales, mientras que los últimos 1 ó 1,5 ml., conteniendo las células mononucleares, se agitan y se inyectan en otro vial con un medio de cultivo;

- ♦ una nueva centrifugación a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos;
- ♦ una aspiración de parte del contenido de ambos viales y su desecho o inyección en correspondientes, mientras que los últimos 1 ó 1,5 ml., conteniendo las células mononucleares, se agitan y se inyectan en un vial contenedor del elemento a implantar o directamente se aplica al paciente.

Además, la parte aspirada del contenido de los viales no desechada e inyectada en los correspondientes viales conteniendo CICA permite la obtención de gel.

De esta forma, la gran ventaja que presenta el procedimiento propuesto es que el mismo se puede llevar a cabo en un medio no estéril, pudiendo ser aplicado con carácter ambulatorio y en consultas, tales como las odontológicas.

Así, el procedimiento que se presenta, aplicable, genéricamente, en implantología, es de especial utilidad para su aplicación en implantes dentales, dado que para su puesta en práctica se necesita una mínima inversión económica, de manera que en una única operación se pueden llevar a cabo los implantes deseados.

Para complementar la descripción que seguidamente se va a realizar, y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña a la presente memoria descriptiva, de un juego de planos, en cuyas figuras de forma ilustrativa y no limitativa, se representan los detalles más característicos de la invención.

#### Breve descripción de los diseños

Figura 1. Muestra una vista de las sucesivas fases relativas al procedimiento de obtención de células mononucleares, partiendo de una extracción sanguínea periférica.

#### Descripción de una realización preferente

A la vista de la comentada figura y de acuerdo con la numeración adoptada podemos observar como una vez que se ha partido de una extracción de sangre periférica, preferentemente, de la flexura del codo, mediante el sistema vacutainer® para rellenar el vacutainer® con suero fisiológico con la sangre extraída y una, posterior, extracción del aire de su interior, en una primera fase se procederá a realizar dos extracciones de 3 ml. cada una de ellas del vacutainer® 1 siendo inyec-

tadas en respectivos viales 2 y 3 que contienen un separador celular.

A continuación, en una segunda fase, los viales 2 y 3 son centrifugados por medio de la centrifugadora 4, uno frente al otro, a 2.000 r.p.m. durante 20 minutos, de forma que las células mononucleares 5 conforman un anillo de color blanco opaco, quedando por encima de ellas la placa leucoplaquetar 6 e inferiormente queda el separador 7 y en el fondo la capa eritrocitaria 8.

En una tercera fase las células mononucleares 5 son aspiradas e inyectadas en correspondientes viales 9 y 10 contenedores de un medio de cultivo, para, en una cuarta fase, ser centrifugados, por medio de la centrifugadora 11, a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos, de forma que las células mononucleares 19 quedan agrupadas en proximidad al fondo del vial.

En una quinta fase se aspira parte 14 del contenido de los viales 9 y 10 y se desecha o inyecta en correspondientes viales 13 y 12 contenedores de CICA, de forma que con los últimos 1 ó 1,5 ml., conteniendo las células mononucleares 19 se agita y se inyecta en otros viales 15 y 16 que contienen un medio de cultivo, de manera que, en una sexta fase, se centrifugan, en la centrifugadora 17, los viales 15 y 16 a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos.

Finalmente, en una séptima fase se aspira parte 18 del contenido de los viales 15 y 16 y se desecha o inyecta en correspondientes viales 20 y 21 contenedores de CICA, de forma que el resto, conteniendo las células mononucleares 19, se agita y se aspira para su utilización, de manera que el mismo puede ser inyectado en un vial que contenga un cuerpo de implante dental, puede ser colocado directamente en un alvéolo donde vaya a ser implantado un implante dental, puede ser mezclado con hueso autólogo o no, etc..

Asimismo, la parte (14)-(18) aspirada del contenido de los viales (9)-(10) y (15)-(16) e inyectada en los correspondientes viales (13)-(12) y (20)-(21) conteniendo CICA permite la obtención de gel.

Así, mediante el procedimiento descrito se permite obtener en pequeñas clínicas células mononucleares de una forma rápida y operativa, sin precisar un laboratorio especializado, siendo de especial aplicación en implantología de carácter ambulatorio.

De esta forma, el procedimiento de obtención de células mononucleares es de especial aplicación en implantología dental, dado que el mismo puede ser aplicado en pequeñas clínicas con carácter ambulatorio, sin necesidad de disponer de un laboratorio especial, por lo que no es precisa una gran inversión económica, y con la ventaja añadida de poder llevarse a cabo en el momento de realizar la operación de implantación.

5

ES 2 222 099 A1

6

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de obtención de células mononucleares, partiendo de una extracción de sangre periférica, preferentemente, de la flexura del codo, mediante el sistema vacutainer® (1), u otro similar, para rellenar el vacutainer® con suero fisiológico con la sangre extraída y una, posterior, extracción del aire de su interior, **caracterizado** porque el procedimiento comprende las siguientes fases:

- ◆ dos sucesivas extracciones de 3 ml. del contenido del vacutainer® (1) siendo inyectadas en respectivos viales (2) y (3) conteniendo un separador celular;
- ◆ una centrifugación, por medio de una centrifugadora (4), de los dos viales (2) y (3), uno frente al otro, a 2.000 r.p.m. durante 20 minutos;
- ◆ una aspiración de la capa de células mononucleares (5) para ser inyectadas en correspondientes viales (9) y (10) con un medio de cultivo;
- ◆ una centrifugación, por medio de una centrifugadora (11), de ambos viales (9) y (10) a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos;

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

◆ una aspiración de parte (14) del contenido de ambos viales (9) y (10) y su desecho o inyección en correspondientes viales (13) y (12), mientras que los últimos 1 ó 1,5 ml., conteniendo las células mononucleares (19), se agitan y se inyectan en otro vial (15) y (16), respectivamente, con un medio de cultivo;

◆ una nueva centrifugación, por medio de una centrifugadora (17), a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos;

◆ una aspiración de parte (18) del contenido de ambos viales (15) y (16) y su desecho o inyección en correspondientes viales (20) y (21), mientras que los últimos 1 ó 1,5 ml., conteniendo las células mononucleares (19), se agitan y se inyectan en un vial contenedor del elemento a implantar.

2. Procedimiento de obtención de células mononucleares, según reivindicación 1ª, **caracterizado** porque la parte (14)-(18) aspirada del contenido de los viales (9)-(10) y (15)-(16) e inyectada en los correspondientes viales (13)-(12) y (20)-(21) conteniendo CICa permite la obtención de gel.

ES 2 222 099 A1

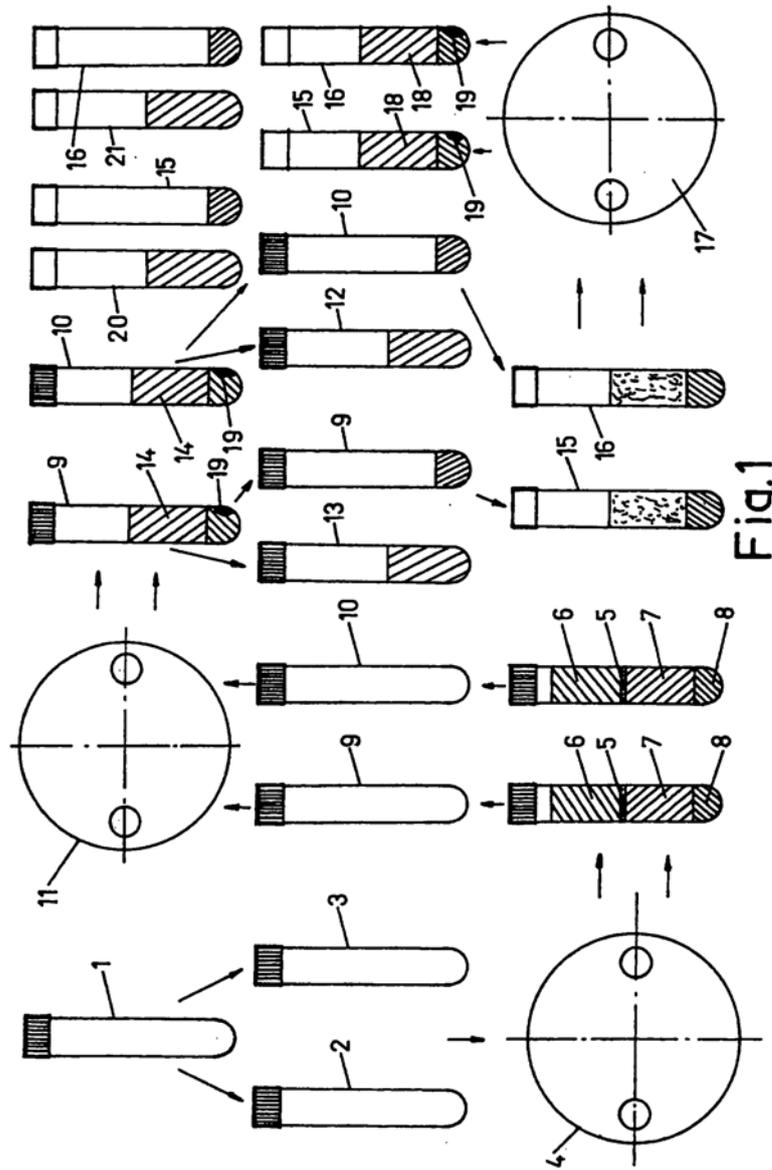


Fig.1



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 222 099

② Nº de solicitud: 200301596

③ Fecha de presentación de la solicitud: 09.07.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 5/08, A61C 8/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 1145692 A2 (ARRUGA ARTAL) 17.10.2001, columna 7, párrafos 40,41,43.	1
E	ES 2212883 A1 (ARRUGA ARTAL) 01.08.2004, resumen.	2
A	US 4927749 A (DORN A.R.) 22.05.1990, ejemplos 2,3.	1
<p><b>Categoría de los documentos citados</b></p> <p>X: de particular relevancia  Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  A: refleja el estado de la técnica</p> <p>O: referido a divulgación no escrita  P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud</p>		
<p><b>El presente informe ha sido realizado</b></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones      <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:</p>		
<p><b>Fecha de realización del informe</b> 17.11.2004</p>	<p><b>Examinador</b> A. Maquedano Herrero</p>	<p><b>Página</b> 1/1</p>

PATENTE III.

**PATENTE US2001/0031445A1**  
**Dental implant and operative method of implantation**



US 20010031445A1

(19) **United States**  
 (12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2001/0031445 A1**  
**Arruga Artal** (43) **Pub. Date: Oct. 18, 2001**

(54) **DENTAL IMPLANT AND OPERATIVE METHOD OF IMPLANTATION**

**Publication Classification**

(75) Inventor: **Alberto Arruga Artal, Zaragoza (ES)**

(51) **Int. Cl.<sup>7</sup>** ..... **A61C 8/00**  
 (52) **U.S. Cl.** ..... **433/173**

Correspondence Address:  
**KLAUBER & JACKSON**  
**411 HACKENSACK AVENUE**  
**HACKENSACK, NJ 07601**

(57) **ABSTRACT**

(73) Assignee: **Alberto Arruga Artal**

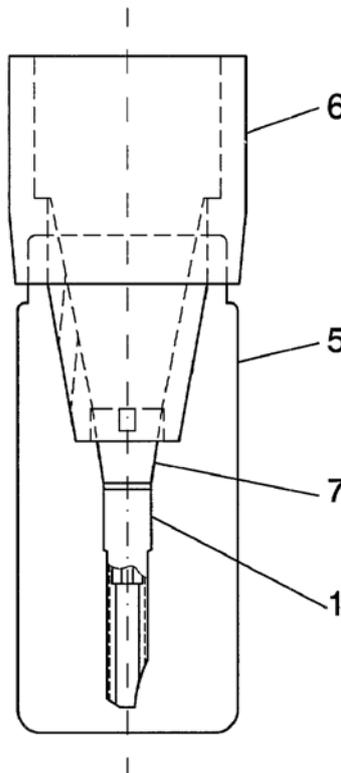
Dental implant and operative method of implantation, being of the type of implant comprising a body that is threaded into the jawbone via which the appropriate securing and fastening bodies for the dental prosthesis are located, the implant body (1) displaying an axial cavity (2) along its entire length, and whose internal base for implantation displays certain drilled holes and/or angular cuts (3) in its lateral surface that define end tabs, the implants being presented individually in their respective sterilized receptacles (5), being joined to the cap body (6) of the receptacle (5) via an intermediate body (7), the cap body (6) defining a cavity (11) with respect to its external base, in which is housed a body (12) made of rubber or similar material.

(21) Appl. No.: **09/823,090**

(22) Filed: **Mar. 30, 2001**

(30) **Foreign Application Priority Data**

Apr. 14, 2000 (ES)..... P200000984



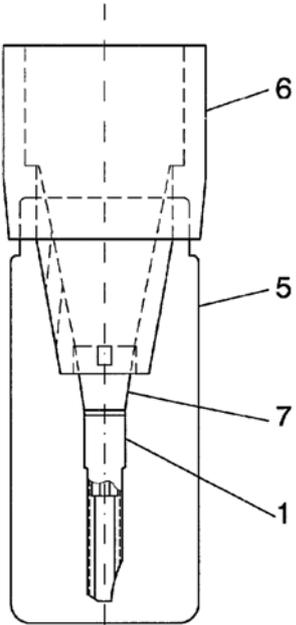


Fig. 1

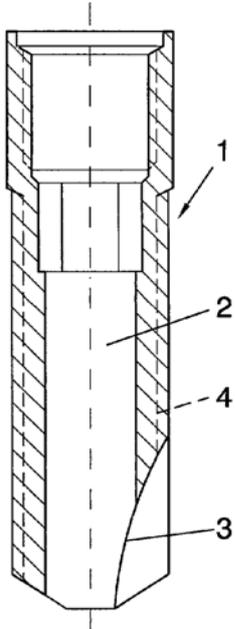


Fig. 2

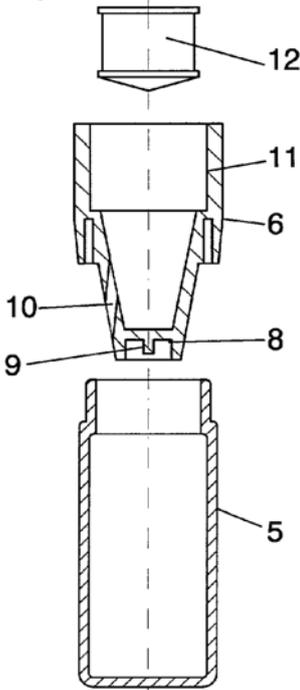


Fig. 3

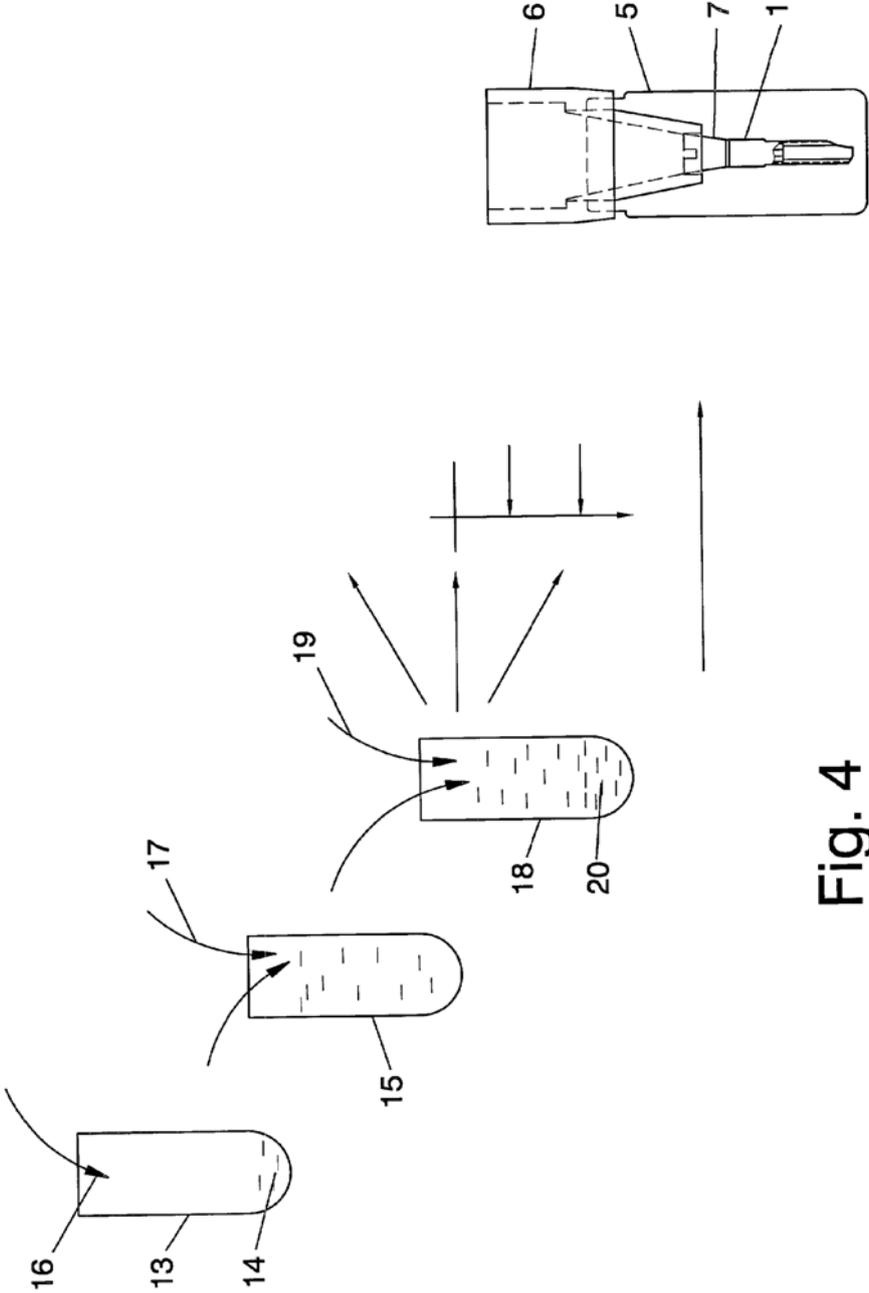


Fig. 4

US 2001/0031445 A1

Oct. 18, 2001

1

## DENTAL IMPLANT AND OPERATIVE METHOD OF IMPLANTATION

### OBJECT OF THE INVENTION

[0001] The following invention, as stated in the summary contained in this description, refers to a dental implant and operative method of implantation, being of the type comprising a body that is threaded into the jawbone and which is provided with a blind opening via which the appropriate securing and fastening bodies for the dental prosthesis are located, in such a way that the implant presented here has a hollow configuration with various angular cuts and/or drilled holes having been made in its base, the implants being individually presented in their respective receptacles, duly sterilized, in which, prior to their implantation, they are kept for a certain period of time in a bath of mononuclear cells washed with a McCOYS culture medium, these cells having been obtained from a blood extraction, duly treated, taken from the actual patient at the moment in which the implant is carried out.

[0002] In this way, and with the mononuclear cells introduced in the receptacle, the aim is to carry out an incubation of the implant for approximately half an hour at a temperature of 37° C., causing the cells to adhere to the implant and minimizing the risk of rejections, as well as facilitating osteo-integration by provoking rapid growth of the bone.

[0003] So, the container receptacle for the implant has a cap to which is joined the implant via an intermediate body, in such a way that in the implantation of the implant in the jawbone the cap itself is used as a tool in the operation of threading the implant into position so that the intermediate body is extracted along with the cap and next the extender bush is positioned threaded to the implant, as well as the remaining elements of the implant in itself, by means of the appropriate tools.

[0004] In addition, in this way, at the same moment of positioning the implants, some pieces having the general shape of a hollow truncated cone are also positioned with some joining bars between them enabling the actual prosthesis of the patient to be positioned, duly adapted.

### FIELD OF APPLICATION

[0005] The dental implant that is presented has application in odontology, being able to be used for the implant of a single dental piece or several pieces, in such a way that by using several implants the full denture can be secured, enabling it to be released in order to facilitate inspections of the state in which all the implants are to be found.

### BACKGROUND OF THE INVENTION

[0006] With the passage of years, odontology has undergone considerable advances, aiming as far as possible to avoid extractions of dental pieces in such a way that, when it is necessary to do this, the extraction can be replaced by a fixed prosthesis and, in the extreme case of a total absence of dental pieces, by a fixed denture in relation to several points of the jawbone.

[0007] So, in the absence of dental pieces, temporary or permanent bridges are positioned, comprising elements of one or more artificial teeth fixed to a support that rests on the natural contiguous teeth.

[0008] If there are a considerable number of dental pieces missing, their replacement is done by means of a partial denture, while if the absence of dental pieces is total, then full dentures are resorted to.

[0009] In such a way, the drawbacks displayed by dentures that are not fixed are considerable and, since some time ago now, the trend has been towards prostheses that are fixed in position.

[0010] So, we can mention European Patent No. 126.624, which claims priority of Spanish Utility Models 272.292 and 279.140, in which separate fixed dental implants are claimed one of them comprising of the assembly of a pair of bodies, one of them being provided at one of its ends with an external thread for being secured to the jawbone, while in relation to its other end it has a central axial opening via which is introduced an end of the second body bearing the dental prosthesis, the two being secured together by pressure.

[0011] The axial central opening of the body fixed to the jawbone is made according to two diameters, the outer one being larger and being provided with an annular groove close to the section of greater diameter, with this threaded body also being provided with an annular groove in its free base into which is located an O-ring joint.

[0012] In the same way, the body bearing the dental prosthesis has its end embedded into that prosthesis and is provided with two annular projections, while its emergent cylindrical end has a staggered undercut in accordance with the internal diameters of the threaded body. An annular projection also existing, located in the smaller diameter end close to the staggering where an O-ring joint is located, partially introduced into the internal annular groove corresponding to the threaded body.

[0013] Likewise, the second implant is composed of two independent pieces, one of which is fixed to the jawbone and the other, bearing the prosthesis, is secured to the first by pressure, the body threaded to the jawbone displaying a central axial opening according to two diameters, the more external section of smaller diameter being provided with a thread and the larger diameter section close to where the smaller diameter arises having an annular recess, while the second body has a general shape of a cylinder, having an annular undercut in relation to the position of the prosthesis and a second undercut, also annular, close to its free base.

[0014] The union of both bodies will be done by providing the pair of undercuts made in the cylindrical body bearing the prosthesis with their respective O-rings which, when that body is fitted under pressure to the body threaded to the jawbone, will remain in relation to the annular undercut made in the section of larger diameter close to the threaded section of smaller diameter and in relation to its upper base.

[0015] So, the system of both is based on the resolution of forces materialized by the pair of O-rings giving the body bearing the prosthesis a movement similar to that of a natural tooth.

[0016] In the actual processing of said European Patent, British Patent 2,063,680, European Patent 0000549 and U.S. Pat. Nos. 4,290,255 and 1,397,067 were all regarded as antecedents, these last two merely belonging to the technical field.

US 2001/0031445 A1

2

Oct. 18, 2001

[0017] In relation to British Patent 2,063,680, we can state that it claims an implant for the jawbone, comprising the union of three elements, which are intimately related to each other at the same time as one of them, the most external, is integral with the jawbone, in such a way that the implant becomes a single piece without any system of resolution of forces.

[0018] On the other hand, European Patent 0000549 claims an endoprosthesis comprising a cylindrical body provided on the inside with axial slots and whose outer surface is provided with a thread, the upper end of it being finished in a conical shape.

[0019] This body is intimately joined by a solid body provided on its outer surface with certain axial slots complementary to the inner slots of the external body, thereby defining an integral body that behaves as if it were a single body, in such a way that it does not display any system of resolution of forces either.

[0020] We can also mention Invention Patent P9602451, from the same applicants as this current paper, which claims a "dental implant" that comprises a shaft that is fixed to the body to which the prosthesis is attached and an extender bush fixed to the body of the implant, this shaft being traversed by the extender body in such a way that with respect to its internal end the shaft displays a pair of radial projections in a diametric position to each other, which remain in relation to the corresponding undercuts made in the internal end of the extender body.

[0021] Moreover, in order to permit ferruling the implants following their immediate insertion, some pieces having the general shape of a truncated cone are joined to the bodies receiving the prosthesis by means of a screw, these pieces displaying one or several radial threads for the securing of certain studs that make them integral to each other.

[0022] In addition, as is well known in haematology, starting from a blood extraction, preferably peripheral, conducted in large hospitals or specialized laboratories, mononuclear cells can be obtained by means of adequate treatment requiring time and cell growth accelerators. These cells can then be used in surgical operations to be performed on the actual patient later on, preferably in implantology or transplants, thereby achieving an increase in these cells.

#### DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0023] This present report describes a dental implant and an operative method of implantation being of the type of implant comprising a body that is threaded into the jawbone via which the appropriate securing and fastening bodies for the dental prosthesis are located, characterized in that the implant body displays an axial cavity along its entire length and that its internal base for implantation displays drilled holes and/or angular cuts in its lateral surface that define end tabs. The implants are presented individually in their respective sterilized receptacles, being joined to the cap body of the receptacle via an intermediate body, the cap body defining a cavity with respect to its external base, in which is housed a body made of rubber or similar material, the cap body of the receptacle being provided with one or several traversing openings for accessing the internal cavity of the receptacle in which the implant is arranged which, prior to its implantation, is immersed in a bath of mononuclear cells with a McCOYS culture medium for a defined period of time and at a defined temperature.

[0024] The cap body of the receptacle for individually housing the implants, displays an internal truncated conical extension, the internal base of which is made to form a cavity with a diametric projection, to which the implant body is attached via the intermediate body for joining with the cap, while the lateral truncated conical surface presents one or various traversing openings via which it is possible to introduce an injector needle containing mononuclear cells washed in a McCOYS culture medium, obtained from a peripheral blood extraction, duly treated, taken from the actual patient on whom the implant is going to be performed.

[0025] of course, the union of the intermediate body with the cap body of the receptacle will be able to be made by different means, since all in all it is a matter of creating a joint between both that will permit them to be handled.

[0026] Moreover, with the operative method that forms the object of the present invention, the separation and subsequent growth of the mononuclear cells is achieved quickly and operatively in small clinics without needing specialized laboratories, and this can be done at the moment when the operation is being performed at local level, without having to be admitted to a hospital.

[0027] So, once blood has been extracted from the patient on whom the implant is going to be performed, by means of the use of receptacles provided with an anticoagulant (for example, citrate), at the moment in which it is going to be handled, the blood is emptied into a receptacle to which the same quantity of serum has been added and this mixture is then emptied into a receptacle containing a cellular separator of density 1077 (e.g., ficoll). It is then centrifuged for a predefined length of time in order to obtain a division into three layers, the lower one of red corpuscles, the central one of mononuclear cells (of density 1077), and the upper layer of plasma.

[0028] Once the central layer of mononuclear cells has been separated, it is washed once with McCOYS culture medium in order to eliminate both the ficoll as well as other residues that might have come from the previous treatment, and a second wash is performed with a McCOYS culture medium. It is then introduced into the receptacle containing the implant body or bodies that are going to be used.

[0029] After that, it is then incubated for a short predefined time at 37° C. in order to produce growth and adhesion of the mononuclear cells to the implant body, and it is then ready for its immediate implantation into the body of the patient.

[0030] The implant body, with the mononuclear cells adhered to it, is implanted by means of the actual cap body in the corresponding opening in the jawbone, permitting the subsequent positioning of all the components for the securing and fixing of the prosthesis by means of the appropriate tools.

[0031] So, the implant body will remain implanted in the jawbone with the intermediate body being withdrawn along with the cap body, so that the shaft with the extender bush and the body to which the prosthesis is fixed can then be positioned. There is the possibility, as claimed in patent P9602451, that in the case of dealing with several implants, a piece can be attached to the bearer bodies of the prosthesis between which some bars are fitted to which the patient's actual denture is positioned at the same instant, thus per-

US 2001/0031445 A1

3

Oct. 18, 2001

mitting the patient to leave the dentist's surgery with the own artificial denture already positioned.

[0032] In order to complement the description that is going to be given below, and with the aim of aiding a better understanding of the characteristics of the invention, this description is accompanied by a set of plans in which figures, the most characteristic details of the invention are represented, in a way that is intended to be illustrative only, rather than restrictive.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0033] FIG. 1. Shows a view of a container receptacle for an implant, the receptacle of which can be injected a solution of mononuclear cells by means of a McCOYS culture medium in order to leave the implant in a bath of that solution.

[0034] FIG. 2. Shows a cross-sectioned view, taken along a longitudinal diametric plane of an implant body, in which it can be seen how the implant has a hollow structure and how its internal end with respect to its position in the jawbone displays certain angular cuts.

[0035] FIG. 3. Shows a cross-sectioned view, taken along a longitudinal diametric plane of the container receptacle for the implant, showing an exploded view with the cap and a plug body made of rubber or similar.

[0036] FIG. 4. Shows a view of the different phases of the operative method for the preparation of an implant for its implantation, having previously been kept in a bath of mononuclear cells with a McCOYS culture medium so that these cells can become adhered to it.

#### DESCRIPTION OF AN EMBODIMENT OF THE INVENTION

[0037] With regard to the figures mentioned above and in accordance with the numbering adopted, we can see how the implant body 1 displays a central axial cavity 2 along its entire length and in its internal base with respect to its implantation displays certain angular cuts 3 having as well the securing thread 4 for attachment to the jawbone. The implant body 1 is structured for the assembly of the elements relating to the implant for the securing and fixing of the dental prosthesis. The angular cuts 3 can be replaced by a series of holes.

[0038] In order to facilitate the handling of the implants, they come individually presented in their corresponding sterilized receptacles 5, in such a way that the implant bodies 1 are joined to the actual cap 6 of the receptacle by means of an intermediate body 7, with the cap itself 6 of the receptacle being used as a tool for implantation in the hole made in the jawbone for that purpose.

[0039] For this, the cap 6 of the receptacle 5 is in general defined by a cylindrical section and an internal truncated conical extension in such a way that the truncated conical extension that is introduced into the receptacle and the intermediate body 7 for joining with the implant body 1 to the cap 6 are materialized with respect to its internal smaller base, for which the cap has an undercut 8 with a diametric projection 9, this projection 9 coupling and fitting to an undercut made in the intermediate body so as to permit it to be pulled along when the cap is rotated at the moment of the implantation.

[0040] Of course, the union of the intermediate body 7 with the cap 6 can be produced in different ways, at all times bearing in mind that the implantation of the implant body 1 into the jawbone will be done by means of the cap. This union can be achieved by means of a polygonal cavity or other similar means.

[0041] Likewise, the cap body 6 displays a cavity according to the two sections defining it, in such a way that, with respect to the lateral truncated conical surface, it displays a series of traversing openings 10, permitting the passage of an injector needle, while in the cavity 11 relative to the external hollow cylindrical section, it displays a plug body 12 made of rubber or similar material in order to leave the assembly sealed.

[0042] With the operative method forming the object of this invention, the aim is to obtain in small clinics, the separation and subsequent growth of mononuclear cells in a quick and operative manner, without requiring specialized laboratories, and being able to do so at the moment in which the operation of implantation is going to be carried out at local level without having to be admitted to a hospital.

[0043] So, a blood extraction 16 is taken in the conventional manner from the patient who is going to receive the implant, by means of the use of receptacles 13 provided with an anticoagulant 14 (e.g., citrate). At the moment of handling it is emptied into the receptacle 15 to which is added the same quantity of serum 17, this mixture is next emptied into a receptacle 18 containing a cell separator 19 of density 1077 (e.g. ficoll); the mixture 20 is centrifuged for a predetermined length of time in order to obtain a division into three layers, the lower one comprising red corpuscles; the central one, mononuclear cells of density 1077 and the upper one, plasma.

[0044] Once the central layer of mononuclear cells has been separated it is washed once in a McCOYS culture medium in order to eliminate both the ficoll as well as other residues that might be left over from the previous treatment, and then a second wash is performed with a McCOYS culture medium and it is then introduced into the container receptacle 5 of the implant body 1 that is going to be used.

[0045] Of course, several receptacles can be used simultaneously with their corresponding implant bodies 1, depending on the number of implants to carry out.

[0046] Later on, it is incubated for a predetermined length of time at 37° C. in order to provoke the growth and adhesion of the mononuclear cells to the implant body 1, which is then ready for its immediate implantation into the patient.

[0047] In order to proceed to the implantation of the implant body 1 with mononuclear cells adhered to it, the procedure will be by means of the cap body 6, the implant body 1 being implanted in the corresponding opening made in the jawbone for that purpose, and the intermediate body 7 being extracted with the cap 6, and leaving the implant body 1 prepared for receiving the shaft with the extender bush and other components by means of the appropriate tools.

1. DENTAL INPLANT AND OPERATIVE METHOD OF IMPLANTATION, being of the type of implants comprising a body that is threaded into the jawbone via which

US 2001/0031445 A1

Oct. 18, 2001

4

the appropriate securing and fastening bodies for the dental prosthesis are located, wherein the implant body displays an axial cavity along its entire length, and whose internal base for implantation displays drilled holes and/or angular cuts in its lateral surface that define end tabs, the implants being displayed individually in their respective sterilized receptacles, being joined to the cap body of the receptacle via an intermediate body, the cap body defining a cavity with respect to its external base, in which is housed a body made of rubber or similar material, the cap body of the receptacle being provided with one or several traversing openings for accessing to the internal cavity of the receptacle in which the implant is arranged which, prior to its implantation, is immersed in a bath of mononuclear cells with a McCOYS culture medium for a defined period of time and at a defined temperature:

**2. DENTAL IMPLANT AND OPERATIVE METHOD OF IMPLANTATION**, according to claim 1 wherein the cap body of the receptacle for individually housing the implants, displays an internal truncated-conical extension in the internal base of which a cavity is made with a diametric projection, to which is joined the implant body via the intermediate body for joining with the cap, while the truncated-conical lateral surface displays one or several traversing openings via which an injector needle can be introduced containing mononuclear cells washed in a McCOYS culture medium, obtained from a peripheral blood extraction, duly treated, made on the actual patient on whom the implant is to be made.

**3. DENTAL IMPLANT AND OPERATIVE METHOD OF IMPLANTATION**, according to claims 1 and 2 wherein, once the blood has been extracted from the patient, it is kept in the corresponding extraction receptacle provided with an anticoagulant, a predetermined quantity is emptied into a receptacle to which has been added an identical quantity of serum, the mixture obtained being introduced into a receptacle containing a cell separator of density **1077**, centrifuging it in order to separate it into different layers of blood components, the layer with mononuclear cells that is obtained being extracted to carry out two consecutive washes in McCOYS culture medium and then introduced into the container receptacle of the implant to be implanted, incubating it for a predetermined length of time at a constant temperature of 37° C. so that the mononuclear cells become adhered to the implant body, which is then ready for its immediate implantation.

**4. DENTAL IMPLANT AND OPERATIVE METHOD OF IMPLANTATION**, according to the above claims wherein the implant body with mononuclear cells adhered to it is implanted by means of the actual cap body into the corresponding opening in the jawbone, permitting the subsequent positioning of all the securing and fastening components of the unitary or complete prosthesis by means of the corresponding tools for doing this.

\* \* \* \* \*