

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública**

**TESIS DOCTORAL**

**EVALUACIÓN DE LA SUPERFICIE B+ EN CARGA  
TEMPRANA DE IMPLANTES DENTALES**

**MARÍA LOURDES GUTIÉRREZ GARRIDO**

**DIRECTORES**

**PROF. D. PABLO GALINDO MORENO**

**PROF. D. MIGUEL PADIAL MOLINA**

**GRANADA 2024**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: María Lourdes Gutiérrez Garrido  
ISBN: 978-84-1195-336-8  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92545>

# UNIVERSIDAD DE GRANADA

## FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



El trabajo de investigación que se expone en la siguiente Tesis Doctoral, titulada “**Evaluación de la superficie B+ en carga temprana de implantes dentales**”, ha sido realizado bajo nuestra dirección por la doctoranda Doña María Lourdes Gutiérrez Garrido.

Una vez redactada, la presente memoria ha sido revisada y es adecuada para ser presentada y permitir a la doctoranda aspirar al título de Doctora ante el Tribunal que se designe.

Garantizamos, además, que hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Pablo Galindo Moreno  
Catedrático de Cirugía Bucal e  
Implantología

Miguel Padiál Molina  
Profesor Titular de Cirugía Bucal e  
Implantología

Granada, enero de 2024

A mi familia



## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi querido Profesor Dr. Pablo Galindo Moreno**, guía, jefe, compañero, director de Tesis y amigo. Gracias por confiar en mí desde tercero de carrera hasta el día de hoy.

Por Impulsarme a estudiar en Estados Unidos y a siempre tener altas miras, no conformarme con la tercera división. Hay que jugar en primera.

Es sorprenderte como nada te para. Esa actitud de superación continua hace que sea un ejemplo para todos. Gracias por apoyarme en los momentos más difíciles, siempre con ganas de superación y valentía. Como has dicho muchas veces: “sueña y te quedarás corto”. Seguimos soñando. Tu casi hermana pequeña. Gracias por tanto.

**Al Prof. Dr. Miguel Padial Molina**, director de Tesis, compañero y amigo, gracias por tu paciencia, trabajo y buenos consejos. Quién me iba a decir a mí que serías mi director de Tesis cuando estudiábamos la carrera. Una alegría y orgullo muy grande. De Vélez tenías que ser. Gracias de corazón por todos estos años al pie del cañón, siempre ayudándome en todo. Por ese don de simplificar lo difícil y hacerlo todo más llevadero. Gracias por ese último empujón de ánimo que tanto necesitaba.

A la **Profa. Dra. Elena Sánchez**, por sus palabras de cariño, ánimo y disponibilidad durante todo el proceso. Muchas gracias por acompañarme durante la carrera, y ser fuente de inspiración de este maravilloso equipo que formamos. Tu sonrisa, ganas de enseñar y esa paz que transmites han sido tangibles todo este tiempo.

Sin ellos no habría llegado hasta aquí.

A mis compañeros y amigos de clínica: Roque, Lucía, Ana, Carolina, Ada, y Claudia, por compartir conmigo esta etapa. Por todas las risas y buenos ratos juntos. Las desesperaciones en clínica y a la vez satisfacciones. Nunca olvidaremos estos años.

Gracias Nati por tus palabras de ánimo y tu trabajo en el laboratorio. Por dedicar tu tiempo a enseñarme las técnicas siempre con una sonrisa.

Gracias también al Prof. O'Valle y al Prof. Duarte. Ha sido un honor contar con ellos en esta Tesis. Gracias por vuestras enseñanzas y visión para elaborar parte de este proyecto.

Al personal de la Facultad de Odontología, en especial a Conchi, Teresa y Pedro que han facilitado el trabajo en clínica con alegría, buena actitud y agrado.

A todos los pacientes que generosamente se han prestado para realización de este estudio.

A la Cátedra MIS Implants Technologies – Universidad de Granada, por el apoyo al presente proyecto de investigación.

A todas las personas que, de distintas formas, han colaborado para que este trabajo sea una realidad.

A mi Familia, el pilar de mi vida. Sin ellos nada sería posible. Son el mejor regalo que uno puede tener. Mi fuente de apoyo y amor diario. Siempre están a mi lado.

Las palabras se quedan cortas. Os quiero muchísimo. No puedo ser más afortunada.

Ellos me han enseñado que la verdadera Felicidad consiste en hacer el bien.

Por último, doy gracias a Dios por estar en mi vida.

A todos Gracias, Siempre Gracias.



*Un viaje de mil millas comienza con un primer paso*

Lao-Tse

*Nunca sabremos todo lo bueno que una simple Sonrisa puede llegar a hacer*

Teresa de Calcuta



# *ÍNDICE*



# ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>9</b>
<b>2.A. Osteointegración</b> .....	<b>9</b>
2.A.1. Tejido óseo .....	10
2.A.2. Osteogénesis periimplantaria .....	13
<b>2.B. Superficies y modificaciones</b> .....	<b>17</b>
2.B.1. Modificaciones de la superficie de los implantes.....	19
2.B.2. Modificación con multifosfonato .....	20
<b>2.C. Tiempo de carga</b> .....	<b>21</b>
<b>2.D. Microbiota y pérdida ósea marginal</b> .....	<b>26</b>
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>37</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>41</b>
<b>4.A. Objetivo general</b> .....	<b>41</b>
<b>4.B. Objetivos específicos</b> .....	<b>41</b>
<b>5. Materiales y Métodos</b> .....	<b>45</b>
<b>5.A. Condicionantes éticos, diseño y localización del estudio</b> .....	<b>45</b>
<b>5.B. Población de estudio</b> .....	<b>46</b>
<b>5.C. Procedimientos clínicos</b> .....	<b>47</b>
<b>5.D. Mediciones clínicas</b> .....	<b>50</b>
<b>5.E. Examen radiológico y mediciones</b> .....	<b>51</b>
<b>5.F. Biofilm intrasulcular</b> .....	<b>53</b>
5.F.1. Obtención de muestras .....	53

5.F.2.	Extracción de ADN.....	53
5.F.3.	Construcción y cuantificación de librerías de DNA .....	54
5.F.4.	Análisis de datos .....	55
<b>5.G.</b>	<b>Medida de resultado primaria .....</b>	<b>55</b>
<b>5.H.</b>	<b>Tamaño de la muestra.....</b>	<b>56</b>
<b>5.I.</b>	<b>Ciego .....</b>	<b>56</b>
<b>5.J.</b>	<b>Aleatorización .....</b>	<b>56</b>
<b>5.K.</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b><i>Resultados</i>.....</b>	<b>61</b>
<b>6.A.</b>	<b>Población de estudio.....</b>	<b>61</b>
<b>6.B.</b>	<b>Resultados a 1 año .....</b>	<b>62</b>
6.B.1.	Resultados clínicos.....	62
6.B.2.	Resultados radiográficos .....	71
<b>6.C.</b>	<b>Resultados a 5 años .....</b>	<b>81</b>
6.C.1.	Resultados clínicos.....	81
6.C.2.	Resultados radiográficos .....	87
<b>6.D.</b>	<b>Resultados microbiológicos .....</b>	<b>99</b>
<b>7.</b>	<b><i>Discusión</i> .....</b>	<b>123</b>
<b>8.</b>	<b><i>Conclusiones</i> .....</b>	<b>157</b>
<b>9.</b>	<b><i>Bibliografía</i>.....</b>	<b>161</b>
<b>10.</b>	<b><i>Anexos</i>.....</b>	<b>177</b>
<b>10.A.</b>	<b>Anexo 1: Justificante de Aprobación Ética del Estudio ...</b>	<b>177</b>

<b>10.B. Anexo 2: Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado para participación en el estudio.....</b>	<b>179</b>
<b>10.C. Anexo 3: Publicación .....</b>	<b>187</b>
10.C.1. Referencia completa .....	187
10.C.2. Indicios de Calidad.....	187
10.C.3. Publicación .....	187



# ***RESUMEN***



## **1. RESUMEN**

### **INTRODUCCIÓN**

Lograr la respuesta celular óptima y el éxito clínico representa uno de los desafíos fundamentales en el campo de la Implantología. En las últimas décadas, el avance tecnológico ha desempeñado un papel crucial al reducir los tiempos de espera, logrando acelerar el proceso de osteointegración mediante el empleo de técnicas específicas, como pueden ser las técnicas basadas en modificar la superficie del implante. Las modificaciones de las superficies pueden desempeñar un papel fundamental al mejorar la respuesta celular del entorno óseo, lo que a su vez actúa como un estímulo para el éxito clínico. Recientemente, ha surgido un innovador enfoque que implica la aplicación de una monocapa de multifosfonato que se une de manera permanente al titanio del implante, replicando la superficie de la hidroxiapatita natural. Se ha establecido que este tratamiento no solo carece de problemas de seguridad, sino que también puede acelerar la osteointegración. Sin embargo, aún persiste la incertidumbre en cuanto a su impacto en la pérdida ósea marginal, un factor crucial para anticipar la aparición de periimplantitis. Además, existe una falta de información suficiente acerca de la viabilidad de la carga protésica temprana sobre implantes con esta modificación superficial. Tampoco sabemos si hay cambios o diferencias a lo largo del tiempo en la microbiota cuando los implantes son cargados de manera convencional o temprana.

### **OBJETIVOS**

1. Comparar el éxito clínico y radiológico tras la carga protésica de implantes modificados en superficie con multifosfonato sometidos a carga temprana en comparación con implantes del mismo tipo sometidos a carga convencional.
2. Evaluar la dinámica temporal de los cambios de nivel de hueso marginal alrededor de los implantes cargados de forma temprana o convencional.

3. Valorar la posible influencia de diversos factores clínicos dependientes del sitio o del paciente en el nivel de hueso marginal alrededor de los implantes cargados de forma temprana o convencional.

4. Analizar el perfil microbiológico alrededor de los implantes tratados con multifosfonato después de ser cargados de manera temprana o convencional.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se llevó a cabo un ensayo clínico controlado aleatorio de dos grupos paralelos. En ambos grupos se colocó el mismo tipo de implante con recubrimiento de multifosfonato, y conexión interna de tipo cónico en ausencia de dientes unitarios para ser restaurados con una corona metal-cerámica atornillada. Según la aleatorización, se procedió a iniciar la carga protésica tras 8 semanas (carga convencional) en el grupo control o tras 4 semanas (carga temprana) en el grupo test. Se registró información clínica, radiográfica del área analizada y microbiológica a diversos tiempos de seguimiento, incluyendo el momento de la colocación del implante, el momento de la carga protésica, 1 semana después y a los 1, 3, 6, 12 y 60 meses. Entre los datos registrados se incluyó el nivel radiográfico del hueso marginal (MBL) alrededor de los implantes y dientes adyacentes, factores vinculados al paciente y aspectos relativos a la restauración y los tejidos circundantes. Además, se llevó a cabo un análisis de la microbiota del surco en los diversos tiempos de seguimiento, que fueron evaluados mediante tecnología NGS.

## **RESULTADOS**

En el estudio participaron 34 pacientes, de los cuales 18 formaron parte del grupo test y 16 del grupo control. Durante la colocación de los implantes, no se observaron diferencias entre grupos en términos de grosor del tejido, mucosa queratinizada ni ninguna otra variable clínica o radiológica. Al tomar las impresiones, se notó que el tejido era más delgado en el grupo Test, lo que llevó a la utilización de pilares más cortos en este grupo. A pesar de ello, no se

evidenciaron cambios significativos en el nivel óseo marginal ni dentro del grupo a lo largo del tiempo ni entre los grupos. El nivel óseo marginal promedio de mesial y distal en el seguimiento a un año fue de -0,22 (0,37) mm versus -0,15 (0,32) mm en el grupo control versus test, respectivamente, siendo la diferencia no estadísticamente significativa ( $p=0,443$ ). De forma similar, a los 5 años los niveles de hueso marginal fueron de -0,27 (0,50) mm versus -0,52 (1,03) mm en los grupos control versus test, siendo nuevamente las diferencias no significativas ( $p=0,976$ ). Ninguna de las variables clínicas o radiológicas evaluadas tuvo un impacto determinante en el nivel óseo marginal en ninguna visita ni grupo.

El análisis microbiológico de la zona alrededor de los implantes tratados con multifosfonato, ya hubiesen sido cargados de manera temprana o convencional, reveló similitudes entre ambos grupos, sin observarse diferencias significativas en función del momento de la carga. Las discrepancias identificadas se manifestaron principalmente al comparar los datos a lo largo del tiempo, más concretamente comparando las comunidades al inicio de la maduración del surco periimplantario (3 meses) con los resultados a largo plazo (5 años). En el estudio global se identificaron 38 filos, 1290 géneros y 4740 especies microbianas, destacándose 19 filos que cubrieron el 99,97% del total de la comunidad, 29 géneros con abundancia relativa superior al 0,5% y que cubrieron el 93,19% y 41 especies con abundancias relativas superiores al 1%.

Las bacterias pertenecientes a los filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria y Spirochaetes representaron casi el 95% de todas las bacterias detectadas en cualquiera de los momentos analizados. De forma similar, entre los géneros más abundantes se encuentran *Prevotella*, *Haemophilus* y *Streptococcus*, seguidos de *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Veillonella*, *Capnocytophaga*, *Rothia* y *Selenomonas*. Algunos géneros experimentaron cambios significativos en su

abundancia a lo largo del tiempo, como *Neisseria*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Selenomonas*, *Leptotrichia*, *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Schaalia*, *Chryseobacterium*, *Klebsiella*, *Cutibacterium* y *Staphylococcus*. A nivel de especie, se observaron microorganismos que permanecieron estables a lo largo del tiempo, como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* y *Rothia dentocariosa*. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas en la abundancia relativa de algunos otros, como *Veillonella parvula*, *Neisseria mucosa*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus gordonii*, *Moraxella osloensis*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces oris*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Selenomonas sputigena*, *Schaalia odontolytica*, *Neisseria subflava*, *Corynebacterium matruchotii* y *Prevotella jejuni*.

## CONCLUSIÓN

La utilización de implantes con una superficie revestida de multifosfonato para la carga temprana presenta resultados clínicos y radiográficos positivos un año después de la carga y se mantienen hasta los 5 años. No se observaron alteraciones en la pérdida ósea marginal a lo largo del tiempo al iniciar la carga protésica 4 u 8 semanas después de la colocación del implante. Tampoco se observaron diferencias significativas con respecto a la microbiota en función de si se realizó carga temprana o convencional. Sin embargo, sí se observaron cambios significativos en algunos microorganismos a lo largo del tiempo de observación, especialmente entre los 3 y 60 meses de seguimiento.

# *INTRODUCCIÓN*



## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.A. Osteointegración**

La rama de la Odontología encargada de rehabilitar la función y estética de los pacientes con pérdidas dentarias mediante el uso de implantes se conoce como Implantología. La Implantología basa su éxito en un fenómeno biológico denominado “Osteointegración”. La osteointegración fue descrita por primera vez por el profesor Per Ingvar Branemark en el año 1970, si bien sus estudios comenzaron en los años 1950. Tras las investigaciones llevadas por él mismo en Suecia y por André Schroeder en Suiza, la descripción como mecanismo biológico de utilidad para implantes dentales fue aceptada internacionalmente en el año 1982 en la conferencia de Toronto (Branemark 1959).

La osteointegración se define como la unión directa física y estructural entre la superficie del implante dental y el hueso vivo sometido a cargas funcionales y masticatorias. Por tanto, se considera que un implante está osteointegrado cuando no hay movimiento entre el implante y el hueso que está en contacto directo con él.

Los factores clásicos descritos como determinantes de la osteointegración fueron propuestos por Albrektsson y colaboradores en 1986 ((Albrektsson et al. 1986)), e incluyen el material, diseño y superficie del implante, así como el estado del hueso receptor, la técnica quirúrgica y las condiciones de carga del implante.

Según esto, para la osteointegración, la superficie del implante juega un papel especialmente relevante ya que la unión se produce entre el tejido óseo y la capa de óxido superficial en implantes de titanio (Mavrogenis et al. 2009). El entendimiento profundo de estos mecanismos de interacción es lo que ha permitido comprender el fenómeno de la osteointegración y es, sin duda, el único que permite mejorarla con objeto de proporcionar mejores tratamientos

a nuestros pacientes. Para ello es fundamental entender la biología del tejido óseo sobre el que se asentará de modo primordial el implante una vez colocado.

### 2.A.1. Tejido óseo

El tejido óseo es un tejido vascular dinámico que está en constante remodelación a lo largo de la vida. La masa ósea alcanza su máximo entre los 25 y 30 años y comienza a descender a partir de los 40 años, de manera más acentuada en las mujeres tras la menopausia.

Está **compuesto** por (Le et al. 2017):

1. Matriz ósea o mineralizada, formada a su vez por:
  - a. *Fase Orgánica*, conocida como tejido osteoide, compuesta por:
    - i. **Colágenos**, principalmente tipo I, III, V, IX, XIII.
    - ii. **Proteoglicanos**, que fijan los factores de crecimiento condroitín sulfato y queratín sulfato.
    - iii. **Glicoproteínas de adherencia**, que fijan los cristales de hidroxapatita al colágeno.
    - iv. **Osteonectina**, muy importante para la mineralización de la matriz ósea.
    - v. **Proteínas dependientes de la vitamina K**, como la osteocalcina, que captura el calcio que está en la circulación y estimula a los osteoblastos para la remodelación ósea.
    - vi. **Otros factores de crecimiento**, como las proteínas morfogenéticas óseas.
  - b. *Fase Inorgánica*, formada por cristales de hidroxapatita, calcio y fósforo.
2. Células de la matriz no mineralizada:
  - a. *De estirpe mesenquimal*:

- i. **Células osteoprogenitoras**, que pueden diferenciarse a osteoblastos, condroblastos, fibroblastos o adipoblastos dependiendo de los estímulos a los que estén expuestos.
  - ii. **Osteoblastos**, que son las células responsables de la formación del componente mineralizado mediante la síntesis de matriz osteoide y liberación de fosfatasa alcalina para la disminución del pH y precipitación de los cristales de hidroxiapatita.
  - iii. **Osteocitos**, una forma madura de osteoblastos inmersos en la matriz mineralizada en las lagunas osteocitarias que se comunican entre sí mediante un sistema canalicular. Su función principal es la mecano-transducción y la producción de matriz ósea para aumentar la densidad ósea.
  - iv. Existen **otros componentes celulares** y de soporte que incluyen células de revestimiento óseo en el periostio y el endostio, componentes vasculares, y fibroblastos.
- b. *De estirpe hematopoyética*: fundamentalmente células indiferenciadas y **osteoclastos**, derivados a su vez de **monocitos circulantes**. Los osteoclastos son células multinucleadas cuya función principal es la reabsorción del tejido óseo.

En base a esto, el tejido óseo ejerce una serie de **funciones principales** que podríamos clasificar en:

1. Estructural, de protección, ya que forma cavidades alrededor de nuestros órganos vitales protegiéndolos, y de sostén, ya que al tejido

óseo se insertan los músculos y ligamentos con quienes forman el sistema osteomioarticular del aparato locomotor.

2. Forma parte del órgano de la sangre por su función hematopoyética al contener la médula ósea, encargada de formar eritrocitos, leucocitos y plaquetas.
3. También actúa como reservorio principal del calcio y fósforo del organismo.

Respecto a su **estructura**, el tejido óseo se puede clasificar en hueso trabecular (también llamado esponjoso o “*cancellous*” en inglés) que queda a su vez envuelto por el hueso cortical (también llamado compacto). El componente trabecular tiene gran cantidad de matriz ósea no mineralizada mientras que el componente cortical es más abundante en matriz ósea mineral. Así, en base a la proporción de una u otra, en la cavidad oral, Misch clasificó los distintos tipos de hueso en base a su densidad, lo cual podría ser relevante para la colocación de implantes dentales motivo por el que ha sido ampliamente difundida y utilizada (Misch 1990). Según esta clasificación, los tipos de hueso van desde el hueso tipo I, con una gran proporción de cortical, localizado en la zona anterior de la mandíbula y muy denso, al hueso tipo IV, proporcionalmente muy trabecular, localizado en la zona posterior del maxilar y muy poco denso. Radiográficamente, el análisis mediante microtomografía se correlaciona adecuadamente con los resultados obtenidos mediante análisis de tomografía computarizada por haz cónico (González-García & Monje 2013).

Desafortunadamente, se ha interpretado durante mucho tiempo que el hueso de baja densidad es también un hueso de mala calidad. Sin embargo, esta atribución sobre calidad no tiene en cuenta la realidad biológica del tejido. Así, por ejemplo, si analizamos el cuerpo humano y la distribución de tipologías óseas, vemos que los huesos que soportan el peso son principalmente esponjosos, de los que podríamos clasificar como tipo IV. Este tipo óseo se

localiza en las plantas de los pies, manos y, en general, en los extremos de los huesos largos, alejados de las diáfisis en cercanía con las zonas articulares. Por el contrario, aquellas áreas donde el requerimiento no es tanto de carga si no de torsión, la proporción del tipo cortical es mayor, como en las propias diáfisis de los huesos largos. De forma similar, en la cavidad oral, el hueso tipo I se localiza principalmente en la zona anterior mandibular, el tipo II en la región posterior mandibular, el tipo III en la región anterior maxilar y el IV en la región posterior maxilar. Teniendo esto en cuenta, observamos como las regiones que albergan los molares, que soportan grandes cargas masticatorias, están rodeadas de hueso de baja densidad. Esto es así debido a la capacidad de remodelación y respuesta de uno u otro tipo óseo.

El hueso cortical, debido a la menor proporción de tejido no mineralizado, tiene una menor capacidad de cicatrización y esta es también más lenta. Por el contrario, el hueso esponjoso, rico en tejido no mineralizado y, por tanto, células y vasos, así como una gran superficie de endostio es capaz de reclutar nuevas poblaciones de células osteogénicas, derivadas de las superficies trabeculares, así como células derivadas de los monocitos circulantes, que se diferenciarán a osteoclastos, con lo que la respuesta de remodelación es potencialmente mayor y más rápida. Por tanto, podríamos decir que el hueso tipo IV, rico en hueso trabecular es claramente superior desde el punto de vista de la potencialidad en la respuesta biológica (Davies 2003).

#### 2.A.2. Osteogénesis periimplantaria

Tras la colocación de un implante dental, una vez producido el daño al tejido óseo inducido quirúrgicamente, nos vamos a encontrar principalmente con tres fases diferenciadas:

1. Fase Inflamatoria que ocupa desde el día 1 hasta el 10 aproximadamente. Esta fase comienza de forma similar a lo que ocurre tras una fractura ósea, es decir, el daño en los vasos sanguíneos genera

una hemorragia y la inducción de la formación de un coágulo. Dicho coágulo se absorbe sobre las superficies del hueso dañado y también del implante, depositando sobre ellas diversas proteínas plasmáticas y macromoléculas adhesivas como los glucosaminoglicanos, albúmina, fibronectina y vitronectina, fundamentalmente (Kato et al. 2000).

Segundos más tarde tiene lugar la adhesión plaquetaria a la superficie del implante, liberando tromboxanos y factores de crecimiento, como el PDGF, TGF- $\beta$ , citoquinas, serotonina e histamina. Así, se activarán los factores VII, X y V, transformando la protrombina en trombina que escinde los fibrinopéptidos del fibrinógeno para producir el coágulo de fibrina. Esta matriz provisional de fibrina servirá de andamiaje para la migración celular ya que su formación es simultánea a la liberación de citoquinas que inducen una respuesta celular inflamatoria inespecífica mediada por monocitos-macrófagos, leucocitos agranulocitos encargados de fagocitar los productos de degradación del tejido y restos necróticos ocasionados por el daño directo del procedimiento quirúrgico y por la isquemia local por la falta de vasos sanguíneos. Se liberan en esta fase una gran cantidad de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , FGF, y MIP-1, entre otros.

2. Fase Proliferativa, que ocupa desde el día 3 al 42, aproximadamente. En esta fase se produce un aumento de la permeabilidad vascular. Como resultado, las células endoteliales promueven más vasodilatación y angiogénesis. Ya que las células perivasculares son células mesenquimales, se promueve también la diferenciación de las mismas a osteoblastos y fibroblastos. Así, se origina la producción de tejido conectivo inmaduro.

A partir del día 7, el hueso previamente dañado es eliminado por los osteoclastos, dejando espacio para nuevo hueso. La liberación de BMP y otros factores presentes en la matriz mineralizada que está siendo

reabsorbida, así como de las propias plaquetas activadas en la fase anterior estimula a los osteoblastos y otras células mesenquimales que migran a la superficie del hueso sobre el que ha actuado el osteoclasto y a la superficie del implante para depositar una matriz orgánica u osteoide que se mineraliza.

Durante esta fase, según Osborn y colaboradores (Osborn & Newesely 1980), podemos diferenciar, por tanto, la situación en la que los osteoblastos se posicionan sobre el hueso que rodea el implante o sobre la superficie del implante en sí. De esta forma, se describen los fenómenos de *osteogénesis a distancia* y de *osteogénesis de contacto*. Son dos fenómenos distintos pero que ocurren de forma simultánea. Según esto, en la osteogénesis a distancia el tejido óseo nuevo se forma sobre el hueso previamente dañado y crece desde la superficie del hueso que rodea al implante, es decir, hacia dentro desde el borde de la osteotomía. Por el contrario, en la osteogénesis de contacto hay una migración directa de las células formadoras de hueso a través de la matriz del coágulo hacia la superficie del implante, donde el nuevo tejido óseo se forma y se extiende hacia el borde de la osteotomía.

El anclaje del nuevo tejido óseo sobre el tejido óseo antiguo se produce mediante una línea de cementación depositada sobre la superficie del hueso recién creado por el osteoblasto, especialmente en el suelo de la laguna de Howship. Se trata de una superficie pobre en componente mineral, que ha sido disuelto, pero en la que parte del componente orgánico, principalmente colágeno, no ha sido digerida. Sobre esta estructura liberará el osteoblasto dicha línea de cementación como una matriz pobre en colágeno, que a medida que progresa hacia fuera de la superficie creada por el osteoclasto pasa a ser la matriz osteoide que se mineraliza, siendo la línea de cementación la interfaz entre la nueva matriz ósea y la antigua. De forma equivalente, Davies y

colaboradores describen que las líneas de cementación son también las estructuras que se forman sobre la superficie de los implantes en el proceso de osteointegración, desempeñando un papel muy importante en la unión exitosa entre el hueso nuevo y el existente (Davies 2007). En contraposición, también se ha descrito la posibilidad de unión química directa entre la superficie del implante y el propio componente mineral del hueso, lo que en todo caso requeriría implantes con superficies minerales similares a los componentes minerales del propio hueso (Hench et al. 1971).

3. Fase de Remodelación, que ocurre a partir del día 28 gracias a la sinergia de los osteoblastos y los osteoclastos y al balance RANK-RANKL-OPG. Durante esta fase se produce el remodelado de la matriz ósea inmadura formada en la fase anterior, dando lugar al tejido óseo maduro (Mavrogenis et al. 2009). El proceso de remodelación será, a partir de aquí, continuo y adaptativo a lo largo de la vida del implante en respuesta a los estímulos mecánicos o agresiones externas que pueda sufrir el área de contacto hueso-implante.

No debemos olvidar nuevas teorías, lideradas principalmente por Thomas Albrektsson, basadas en el principio de osteo-inmunología. Este campo de estudio ha dado pie a una novedosa interpretación de la osteointegración, según la cual el proceso de formación ósea sobre la superficie de implante sería una reacción ósea inmunológica en lugar de una reparación. Se introduce además el concepto de “equilibrio de cuerpo extraño” (“*foreign body equilibrium*”) que explica que la osteointegración seguiría el mismo proceso que ocurre en la pérdida ósea marginal, pero que en este, al combinarse las acciones de la interacción del hueso con el implante, con el tejido blando y con las bacterias del surco, el equilibrio se rompe y como consecuencia hay una mayor activación de las actividades destructivas (Albrektsson et al. 2022). Debemos decir, no obstante, que, aunque estas teorías parecen particularmente

interesantes y justificadas, hasta la fecha se encuentran aún en profundo proceso de estudio y discusión en la literatura.

En cualquiera de los casos, la interacción entre el tejido óseo y el implante está enormemente influenciada por las características de la superficie de este, motivo por el que debe ser analizada.

## **2.B. Superficies y modificaciones**

Las características de la superficie del implante dental desempeñan un papel crítico en la osteointegración al afectar la adhesión celular, la formación de tejido óseo y la estabilidad a largo plazo del implante. Por tanto, la elección de la superficie del implante debe ser una consideración importante en la planificación para la colocación de implantes dentales, ya que de ella depende en gran medida el éxito clínico. Así, desde las originales superficies pulidas, por distintos métodos, se ha pasado a proponer numerosas modificaciones de superficie con el objetivo de acelerar el proceso de osteointegración (Ellingsen et al. 2004; Padial-Molina et al. 2009; Rupérez et al. 2016; Sevilla et al. 2018; Cirera et al. 2020).

La capacidad de la superficie del implante para retener fibrina durante la fase de cicatrización de la herida es fundamental ya que las células óseas migrarán a la superficie del implante a través de esta formando hueso en la superficie, como se ha descrito anteriormente. Además, la velocidad a la que este proceso ocurre se ha convertido también en un factor especialmente relevante en la implantología actual. La tendencia es acortar los tiempos, con el objetivo de rehabilitar a nuestros pacientes lo antes posible. Por tanto, siendo las propiedades superficiales de humectabilidad, rugosidad, energía y carga superficial, funcionalidades químicas y composición, así como las características de las células, las propiedades que determinan la cantidad y la calidad de la adherencia celular, y en consecuencia, el crecimiento tisular y el

éxito clínico a largo plazo, debemos detenernos en este aspecto (Padiál-Molina et al. 2009, 2011; Herrero-Climent et al. 2020).

Las primeras modificaciones se propusieron en los años 1980, cuando se inició el estudio de superficies como la TPS (“*titanium plasma sprayed*”), o la HA (con un recubrimiento de hidroxiapatita). En general, eran superficies muy rugosas que tendían a generar fracaso de la osteointegración o pérdidas marginales inaceptables. Por tanto, se propusieron superficies de rugosidad moderada. Entre ellas, se debe mencionar a la superficie SLA y a la TiUnite, muy populares en su momento y, de hecho, la base de prácticamente todas las superficies actualmente disponibles en el mercado. Se trata de superficies que son sometidas a un proceso de chorreado y posteriormente grabado ácido con lo que se crean diferentes grados de microrugosidad. La superficie TiUnite, además, presenta una reorganización del material en la superficie con lo que la capa de óxido se ve aumentada. Según los estudios de Albrektsson y Wennerberg (Albrektsson & Wennerberg 2004a b), el hueso responde mejor a las superficies con una rugosidad moderada de 1,0-2,0 micras, comparado con superficies lisas o muy rugosas. Así, en otro trabajo de revisión, se analizaron los resultados de las superficies más importantes a nivel comercial, como son TiUnite (Nobel Biocare), SLA (Straumann), Osseotite (3I), Frialit-2 and CellPlus (Dentsply /Friadent), TiOblast y Osseospeed (Astra Tech). Según este trabajo, todas las superficies tienen una rugosidad moderada, pero que, a pesar de obtener buenos resultados en todas las superficies, las distintas compañías en general lanzaban y lanzan en la actualidad su producto al mercado sin suficiente documentación clínica previa. Según el estudio, solo la superficie Osseospeed tenía documentación clínica previo a la campaña de marketing (Albrektsson & Wennerberg 2004b). Por este motivo, debemos ser conscientes de cuáles son las modificaciones superficiales que han sido estudiadas para poder valorar así su uso clínico.

### 2.B.1. Modificaciones de la superficie de los implantes

Los métodos fundamentales de modificación superficial se basan o bien en la adición o bien en la sustracción, con objeto de limpiar la superficie y eliminar la capa superficial, modificar la estructura y topografía o modificar la composición y estructura de la superficie mediante la formación controlada de un recubrimiento bioactivo (Smeets et al. 2016).

Así, ejemplos de sustracción incluyen los procesos de arenado, que consiste en remover la capa de óxido mediante un chorreado con partículas, generalmente de sílice, lo que incrementa la rugosidad. En el mismo sentido, el grabado ácido también consigue modificar la superficie, pero en este caso eliminando la tensión superficial generada por el arenado, además de generar también micro rugosidades. En el otro extremo nos encontramos los procedimientos de adición que principalmente persiguen la unión de moléculas bioactivas o biomiméticas, con objeto de conseguir que la superficie del implante actúe como una superficie biológica. En este sentido, la modificación mediante la adición de hidroxiapatita como material bioactivo fue uno de los primeros intentos por conseguir una unión química real entre el implante y el hueso circundante. Sin embargo, aunque los resultados obtenidos en estudios preclínicos han sido generalmente positivos, los resultados clínicos no han sido igual de satisfactorios (von Salis-Soglio et al. 2014). La explicación fundamental a esto se debe al hecho de que la estabilidad a largo plazo del recubrimiento era comprometida, lo que inducía resultados clínicos inciertos (van Oirschot et al. 2013). En parte, la inestabilidad del recubrimiento se ha achacado a las diferencias mecánicas entre el núcleo de titanio y el recubrimiento cerámico, pero también a la alta solubilidad e hidrólisis de los fosfatos contenidos en estos recubrimientos (von Salis-Soglio et al. 2014).

### 2.B.2. Modificación con multifosfonato

Para solventar dichas limitaciones, se ha propuesto un tratamiento de superficie basado en una monocapa permanentemente adherida de multifosfonato (Viornerly et al. 2002a). Esta propuesta ha demostrado que las moléculas de multifosfonato unidas covalentemente a la superficie del titanio mejoran la citocompatibilidad de las células osteoblásticas en ratas, ya que forman un andamio para la formación de hueso. Además, estos estudios *in vitro* han demostrado ausencia de efectos citotóxicos asociadas a implantes con superficie modificada con estos ácidos, así como la capacidad de dicha superficie a la hora de inducir la síntesis de colágeno tipo I (Viornerly et al. 2002b). Los fosfonatos son análogos a los fosfatos, pero con una mayor resistencia a la hidrólisis, que además proporcionan una mayor humectabilidad.

Implantes con este recubrimiento han demostrado clínicamente su seguridad, no habiendo diferencias de fracaso entre implantes con o sin el recubrimiento (Esposito et al. 2013). De hecho, este estudio demostró también una menor pérdida ósea marginal alrededor de implantes con este recubrimiento comparado con aquellos que no lo tenían.

Más aún, aunque las superficies convencionales basan la osteointegración en las expuestas anteriormente líneas de cementación, la modificación superficial con la adición de fosfonatos en superficie podría dar lugar a una unión química real entre el implante y el hueso de alrededor. De hecho, ciertos estudios demuestran, además, un incremento de la mineralización ósea temprana de implantes con superficie tratada, lo que daría lugar a una mayor fijación del implante (32%,  $p < 0,05$ ) y a una mayor estabilidad primaria (37%,  $p < 0,05$ ). Por su parte, se ha demostrado un aumento de la superficie de contacto hueso-implante del 39%, así como un aumento de la estabilidad del 21% para estos implantes versus los controles sin tratamiento de superficie (von Salis-Soglio

et al. 2014). Además, la estabilidad biomecánica tan pronto como 2 semanas resultó superior a la encontrada en implantes sin esta superficie.

Por tanto, aunque el uso de esta superficie pudiera parecer ventajoso desde el punto de vista de la aceleración de la curación, los estudios clínicos disponibles no han empleado diversos protocolos de carga para corroborar o no la bondad del tratamiento superficial. Por este motivo, ya que este factor es importante en el diseño de esta Tesis Doctoral, debemos primero describir los distintos tipos de carga protésica, que como se dijo anteriormente es otro de los factores determinantes en la osteointegración.

## **2.C. Tiempo de carga**

El término carga de implante se define como el momento en que este recibe su prótesis, que será sometida a cargas funcionales y masticatorias fisiológicas. Clásicamente, el periodo de tiempo indicado para la cicatrización, previa a la colocación de la prótesis eran 3 meses para la mandíbula y 6 meses para el maxilar debido a su menor densidad ósea (Szmukler-Moncler et al. 2000)). Sin embargo, este largo periodo de espera se acompaña de trastornos funcionales y estéticos además de insatisfacción en los pacientes. Hoy en día sabemos que 8 semanas es más que suficiente para la cicatrización ósea alrededor de los implantes (Ghimire et al. 2018). Estudios in vitro y en animales más recientes con otro tipo de recubrimientos biomiméticos han ido más allá asegurando osteointegración a tan sólo 28 días, es decir, 4 semanas (Cirera et al. 2020). De este modo, son estos tiempos los que se utilizan de hecho para definir los tiempos de colocación de un implante tras la extracción dental y los tiempos de carga de los mismos, ya sean colocados en crestas óseas de extracciones recientes o no.

Así, los tiempos de colocación definidos por el Consenso ITI sobre Protoponcia e Implantología (Morton et al. 2018) se dividen en:

1. *Inmediato*: el implante se coloca en el alveolo el mismo día de la extracción.
2. *Temprana*: el implante se coloca cuando el tejido blando está cicatrizado (4-8 semanas), o cuando existe una cicatrización parcial del hueso (12-16 semanas).
3. *Tardía*: el hueso está completamente cicatrizado cuando se coloca el implante (más de 6 meses tras la extracción).

Del mismo modo, los tiempos de carga se dividen en:

1. *Carga inmediata*: colocación de la prótesis en oclusión de manera inmediata tras la colocación de un implante o durante la primera semana.
2. *Restauración inmediata*: colocación de prótesis sin oclusión de manera inmediata o durante la primera semana.
3. *Carga temprana*: colocación de la prótesis entre una semana y 2 meses tras la colocación del implante.
4. *Carga convencional*: colocación de la prótesis pasados, al menos, dos meses de cicatrización post-implante.

Otra clasificación también ampliamente utilizada combina ambas situaciones de estado del hueso receptor en el momento de la colocación del implante y tiempo transcurrido hasta la conexión de la prótesis (Gallucci et al. 2018).

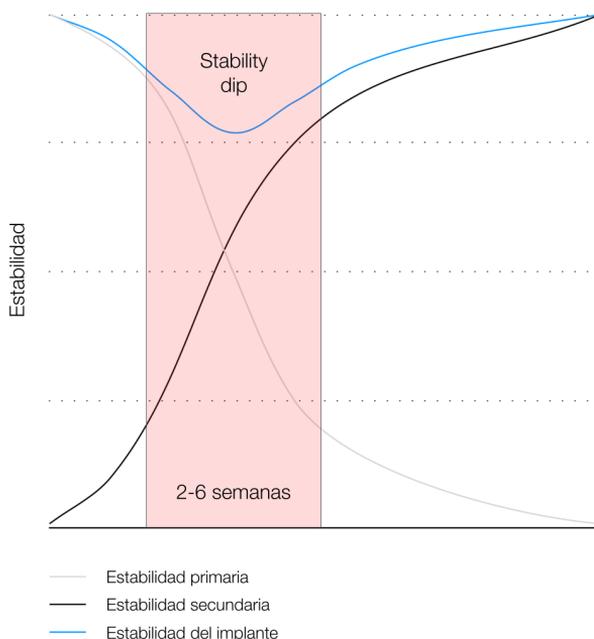
Según esta, podemos clasificar la colocación de implante y prótesis en:

- Tipo 1:
  - Tipo 1A: Colocación inmediata del implante y carga inmediata.
  - Tipo 1B: Colocación inmediata del implante y carga temprana.
  - Tipo 1C: Colocación inmediata del implante y carga convencional.

- Tipo 2:
  - Tipo 2A: Colocación temprana del implante con cicatrización de tejidos blandos y carga inmediata.
  - Tipo 2B: Colocación temprana del implante con cicatrización de tejidos blandos y carga temprana.
  - Tipo 2C: Colocación temprana del implante con cicatrización de tejidos blandos y carga convencional.
- Tipo 3:
  - Tipo 3A: Colocación temprana del implante con cicatrización parcial del hueso y carga inmediata.
  - Tipo 3B: Colocación temprana del implante con cicatrización parcial del hueso y carga temprana.
  - Tipo 3B: Colocación temprana del implante con cicatrización parcial del hueso y carga convencional.
- Tipo 4:
  - Tipo 4A: Colocación tardía del implante y carga inmediata.
  - Tipo 4B: Colocación tardía y carga temprana.
  - Tipo 4C: Colocación tardía y carga convencional.

En cualquiera de los casos, la carga protésica requiere estabilidad del implante. Cabe destacar, eso sí, la diferencia entre estabilidad primaria y secundaria. La estabilidad, en general, podría definirse como la capacidad de un implante para soportar cargas axiales, laterales y rotacionales. La estabilidad primaria se define como un concepto puramente mecánico, es decir, es aquella que conseguimos al colocar el implante y que viene determinada por la técnica quirúrgica, la densidad ósea y el diseño macroscópico del implante. La estabilidad secundaria, en cambio, es la que otorga la propia osteointegración del implante. Así, la estabilidad primaria sería determinante para la realización de carga inmediata mientras que la carga convencional se sustenta en la estabilidad secundaria. En el proceso biológico de remodelación ósea

alrededor del implante una vez insertado y hasta que se produce la adecuada neoformación ósea existe, por tanto, un período crítico en el que la estabilidad primaria decrece como consecuencia de la reabsorción del hueso dañado durante la inserción del implante, pero en el que la estabilidad secundaria aún no ha conseguido alcanzar niveles máximos. A esto se le conoce como “*stability dip*”, o punto de menor cociente de estabilidad entre primaria y secundaria, según los conceptos presentados por Raghavendra y colaboradores en 2005 (Raghavendra et al. 2005), y más tarde, entre otros, por Smeets y colaboradores en 2016 (Smeets et al. 2016). En base a eso se generaron diagramas como el que se presenta a continuación, muy ilustrativos de la situación del implante para ser sometido a carga (**Ilustración 1**). Comprendiendo el proceso de remodelación ósea descrito en anteriores apartados, así como las modificaciones superficiales que pretenden acelerar dicha remodelación, podemos determinar que el tiempo crítico para someter a carga un implante se sitúa entre las 2 y 6 semanas.



**Ilustración 1:** Representación de la estabilidad global del implante y el período crítico para la carga.

Por tanto, determinar la estabilidad del implante para someterlo a carga parece un requisito altamente relevante. La estabilidad primaria del implante viene determinada fundamentalmente por el torque de inserción, que la mayoría de fabricantes recomienda entre 25 y 45 Ncm en base a las pruebas de resistencia del implante en sí. Por analogía, el contratorque sería la herramienta definitiva de la determinación de estabilidad. Sin embargo, al tratarse de un método que puede ser agresivo, suponiendo incluso la pérdida del implante en caso de no estar correctamente integrado, se han propuesto métodos alternativos para realizar estas mediciones. El más conocido es el análisis de frecuencia de resonancia. Fue descrito en 1996 por Meredith y colaboradores, y se basa en la frecuencia de resonancia mediante un transductor unido al implante (Meredith et al. 1996). Sin embargo, aunque estos valores son empleados por muchos como determinantes para la realización de carga protésica (Herrero-Climent et al. 2020), han recibido también numerosas críticas por su falta de fiabilidad, sin existir datos suficientes para extraer conclusiones claras. En cualquier caso, la literatura disponible parece determinar que aunque la estabilidad primaria no sea un requisito indispensable para la consecución de estabilidad secundaria, sí parece claro que una elevada estabilidad primaria, aunque aparentemente beneficiosa para la realización de carga inmediata o temprana, puede promover excesiva presión sobre el hueso que daría lugar a necrosis ósea y como consecuencia una mayor pérdida ósea periimplantaria en las fases de cicatrización (Duyck et al. 2010; Monje et al. 2019).

La pérdida ósea marginal es el requisito diagnóstico para diferenciar entre procesos patológicos reversibles (mucositis) e irreversibles (periimplantitis). Por tanto, es el factor que determinará la estabilidad de nuestros implantes a largo plazo. Hasta el momento, la literatura acepta que los procesos de pérdida ósea marginal se inician, progresan y se perpetúan debido a la acción de la microbiota del surco periimplantario.

## **2.D. Microbiota y pérdida ósea marginal**

La pérdida marginal ósea es el factor diferencial entre estabilidad periimplantaria y progresión de patología alrededor de implantes. Cierta pérdida de hueso alrededor del cuello del implante ha sido considerada como fisiológica, debido a la adaptación de los tejidos blandos periimplantarios, una vez que la corona protésica es colocada en su lugar e integrada en dicho sistema biológico limitado a la interfase ósea y mucosa que existe alrededor de la unión corona implante. En primer lugar, los criterios clásicos de éxito establecieron que hasta 2 mm de pérdida en el primer año podrían ser aceptables (Albrektsson et al. 1986). Sin embargo, ciertas limitaciones estructurales de los implantes de aquella época fueron superadas, como era el tipo de superficies de implantes (lisas o pulidas) y de conexión protésica (externa); ambos factores son conocidos hoy en día como altamente relacionados con pérdidas óseas a nivel marginal. El Consenso de Pisa de la International College of Oral Implantologists asumió esos niveles también como aceptables para determinar el éxito del implante (Misch et al. 2008). Más recientemente la definición de caso de periimplantitis se ha vuelto algo más laxa al introducir otro elemento fundamental: que la pérdida ósea marginal sea progresiva (Renvert et al. 2018). Es por esto que estudios de nuestro grupo han establecido que la pérdida ósea temprana, en los primeros 6 meses, es un indicador con alto valor predictivo para pérdidas óseas futuras, marcando el límite en tan sólo 0,5 mm (Galindo-Moreno et al. 2015, 2022a b, 2023).

La introducción del término “progresivo” en la definición de pérdida marginal ósea patológica es de relevancia. De hecho, existe patología periimplantaria de tipo reversible que cursa con ausencia de pérdida marginal ósea: la mucositis periimplantaria. Por lo tanto, en este sentido, la pérdida marginal ósea se erige en el único parámetro clínico y radiológico que diferencia progresión de enfermedad frente a reversibilidad, es decir, que define periimplantitis y la

diferencia de mucositis periimplantaria, en caso de enfermedad, o de pérdida ósea fisiológica, en el caso de salud periimplantaria.

Por tanto, la colocación de implantes dentales está intrínsecamente asociada a la nueva pandemia que aparece tras su colocación, la periimplantitis, definida como una enfermedad destructiva inflamatoria e irreversible que afecta a los tejidos blandos y al hueso alrededor de los implantes dentales sometidos a carga según múltiples definiciones (Albrektsson & Isidor 1994; Zitzmann & Berglundh 2008; Schwarz et al. 2018).

La periimplantitis fue definida inicialmente como una patología de origen microbiológico, en similitud con la periodontitis. Aunque en la actualidad el concepto ha sido redefinido, y ha pasado a ser considerada como una enfermedad inflamatoria promovida por microorganismos, “*an inflammatory plaque-associated disease*” (Berglundh et al. 2018), existe una gran controversia sobre este hecho. Se argumenta que la enfermedad es de origen microbiológico por tres factores primordiales (Ivanovski et al. 2022):

1. Existe una relación causa-efecto entre la acumulación de biopelículas bacterianas alrededor de los implantes dentales y el desarrollo de inflamación, iniciada como mucositis periimplantaria.
2. Los estudios observacionales muestran que una terapia de mantenimiento no regular y un control deficiente de la placa favorecen un alto riesgo de periimplantitis.
3. Además, las estrategias anti-infecciosas pueden ser eficaces para reducir la inflamación de los tejidos blandos y suprimir la progresión de la enfermedad.

Es obvio que no se puede aislar el efecto del microbioma en el desarrollo de estas patologías ya que no existe ningún modelo clínico en el que se puedan eliminar los microorganismos del entorno periimplantario, para ver el efecto de su ausencia. También es conocido el papel inflamatorio que los

---

microorganismos pueden ejercer como estimuladores de la respuesta del sistema inmune del paciente. Sin embargo, estas afirmaciones de Ivanovski y colaboradores son débiles ya que quedan importantes lagunas por explicar cómo son los siguientes hechos:

- A. Existe patología periimplantaria en presencia de microorganismos, pero también salud periimplantaria en presencia de los mismos microorganismos, incluso en implantes limítrofes a los patológicos.
- B. No se conoce qué agente microbiológico desencadena la patología, ni por el mecanismo que lo haría. De hecho, existe similitud microbiológica entre la composición y distribución del microbioma de implantes sanos, con mucositis periimplantaria y con periimplantitis.
- C. No sabemos si unas determinadas bacterias causan la enfermedad o aparecen como consecuencia adaptativa del nuevo microambiente que se va desarrollando.

No puede describirse ningún microorganismo específicamente implicado en la progresión de la mucositis periimplantaria a la periimplantitis y, de hecho, ambas entidades comparten diversidades bacterianas alfa y beta. Toda esta información en conjunto apunta a que la inflamación de los tejidos blandos periimplantarios puede estar regulada por diferentes factores más allá de los microorganismos. Esta inflamación y neo adaptación bacteriana podría deberse a factores externos, como los niveles de oxígeno, el pH, la presión osmótica, la temperatura, el potencial de reducción-oxidación o los nutrientes proteicos obtenidos del líquido del surco periimplantario (Socransky & Haffajee 2005). La superficie del implante también podría ser un posible factor asociado a las diferencias en la microbiota del surco periimplantario (Sinjab et al. 2023). Li y colaboradores demostraron que cualquier género bacteriano asociado con patología periimplantaria puede ser detectado en todas las condiciones clínicas analizadas (Li et al. 2023). De forma similar, Philip y colaboradores describieron que la mucositis periimplantaria albergaba biopelículas menos

anaerobias y complejas con menor biomasa que los pacientes con gingivitis emparejados; sin embargo, ambos ecosistemas promovían una respuesta inflamatoria similar (Philip et al. 2022).

En relación con la implicación del microbioma con la periimplantitis, Belibasakis y Manoil afirmaron que “en esencia, la periimplantitis es una infección endógena mixta, que en ocasiones implica bacterias orales atípicas. Esto puede implicar una contribución extraoral a la infección, aunque sigue siendo difícil trazar una línea dura en esta definición” (Belibasakis & Manoil 2021). No obstante, la definición del Consenso de 2017 señaló que la periimplantitis es una enfermedad inflamatoria asociada a la placa.

Teniendo en cuenta que la composición de especies del microbioma periimplantario varía ampliamente entre individuos (Yu et al. 2019), e incluso dentro del mismo individuo en distintas localizaciones, existe una tendencia a asimilar que las bacterias que promueven la enfermedad periodontal tienen que ser las mismas que las bacterias asociadas a la patología periimplantaria, no solo en taxonomía sino también en carga bacteriana (Kormas et al. 2020). Sin embargo, la literatura es consistente demostrando que existen diferencias entre ambos ecosistemas. Por ejemplo, existe una alta sospecha de que se puede detectar una mayor variedad bacteriana en los dientes en comparación con los implantes (Nowzari et al. 2008; Heuer et al. 2012; Cortelli et al. 2013). Es decir, el microbioma alrededor de los implantes difiere significativamente del microbioma alrededor de los dientes, tanto en la salud como en la enfermedad, siendo heterogéneo en la periimplantitis, pero menos complejo que en la periodontitis. En la periimplantitis predominan las especies gramnegativas (Kumar et al. 2012).

Es importante destacar que el cuerpo de evidencia actual no permite establecer ningún perfil específico consistente de microorganismos asociados a la patología periimplantaria (Sahrman et al. 2020). En esta revisión sistemática, analizando estudios hechos con todo tipo de técnicas de detección bacteriana,

se reportaron 13 estudios que utilizaban técnicas basadas en el cultivo, y se concluyó que, a partir de ellos, ninguna especie microbiana puede declararse característica o específica de la periimplantitis, ya que todas las bacterias analizadas podían encontrarse en la periimplantitis y en los implantes sanos. Ese estudio de Sahrman y colaboradores también encontró 15 estudios basados en técnicas de hibridación y también concluyó que se pueden encontrar diferencias no concluyentes en cuanto al microbioma presente en implantes sanos y en aquellos con periimplantitis. En relación con la metodología basada en PCR utilizada en 28 estudios, se concluyó que ninguna de las especies microbianas analizadas se encontraba de forma exclusiva en ninguna condición (salud, periodontitis o periimplantitis). La prevalencia de los principales periodontopatógenos fue similar en enfermedad y salud, excepto por una prevalencia ligeramente superior de *P. nigrescens* y *E. nodatum* en las muestras de periimplantitis. En cuanto a los estudios realizados mediante pirosecuenciación, se incluyeron 5 estudios. Una vez más, los autores afirmaron que no se encuentra ningún género que muestre algún tipo de especificidad en el tejido sano o patológico que rodea a los implantes. Por último, sólo se incluyó un estudio que utilizaba el análisis meta transcriptómico. Y, una vez más, se identificaron géneros similares en muestras obtenidas de implantes sanos y afectados de periimplantitis (Sahrman et al. 2020). Se obtuvieron resultados similares en otra revisión sistemática en la que se comparó el microbioma de la mucositis periimplantaria con el de la periimplantitis: no se encontró consenso en cuanto a qué condición patológica mostraba una mayor diversidad microbiana. De hecho, se encontraron resultados contradictorios: mientras que un estudio informaba de una variedad similar tanto para la mucositis como para la periimplantitis, otro estudio afirmaba que la periimplantitis mostraba una mayor diversidad bacteriana (de Melo et al. 2020).

Inicialmente, Kumar y colaboradores reportaron que géneros como *Aerofilium*, *Anaerococcus*, *Anaerovorax*, *Burkholderia* y *Exiguobacterium* parecían estar asociados exclusivamente al nicho periimplantario. El microbioma periimplantario estaba compuesto principalmente por los géneros *Actinomyces*, *Butyrivibrio*, *Campylobacter*, *Eubacterium*, *Lactococcus*, *Leptotrichia*, *Peptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Streptococcus* y *Treponema*. Del mismo modo, reportaron que las lesiones periimplantarias se asociaron a niveles más bajos de *Leptotrichia* y *Prevotella*, pero más altos de *Actinomyces*, *Butyrivibrio*, *Campylobacter*, *Peptococcus*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus non mutans*, con relación a los implantes sanos (Kumar et al. 2012).

En cualquier caso, si analizamos la literatura, concentrados en aquellos trabajos que manejan la metodología NGS (“*next generation sequencing*”), la disparidad de resultados microbiológicos en relación a salud, mucositis periimplantaria y periimplantitis es total, y de hecho algunos estudios reportan algunas bacterias como las más frecuentes en salud, mientras que otros afirman que dichas bacterias son las más frecuentes en patología periimplantaria avanzada. Por ejemplo, Da Silva y colaboradores afirmaron que, en pacientes sanos, entre otros, *Atopobium* (filo Actinobacteria) es un género común (da Silva et al. 2014); en cambio, Barbagallo y colaboradores confirmaron que *Atopobium* se detectó significativamente como uno de los géneros más abundantes en la periimplantitis (Barbagallo et al. 2022).

Los profesionales de la Odontología deben plantearse si las enfermedades periodontales y periimplantarias no se caracterizan realmente por un “patobioma”, definido como interacciones nocivas entre comunidades microbianas específicas y sus huéspedes, que conducen inexorablemente de la homeostasis a la enfermedad. En un interesante editorial, Walker y Hoyles señalan que "por desgracia, este término es excesivamente simplista e intrínsecamente erróneo. Los microorganismos y sus metabolitos no son ni

'buenos' ni 'malos', simplemente existen. Sus efectos sobre nosotros como huéspedes dependen en gran medida del contexto. Los microorganismos o metabolitos que son nocivos en un contexto pueden no causar ningún daño en otro" (Walker & Hoyles 2023). Para reforzar aún más la inespecificidad de la flora patológica periimplantaria o periodontal, cabe señalar que, utilizando la tecnología más avanzada, pueden detectarse casi todos los microorganismos en cualquier escenario clínico. Es cierto que existe una transición significativa en la composición de la microbiota de la salud a la periimplantitis, pero esta transición no es diferencial en el estado de patología reversible (mucositis periimplantaria); por lo tanto, entre la salud y la mucositis y también de la mucositis a la periimplantitis. Mason y colaboradores evidenciaron que el microbioma evoluciona desde el estado predentario hasta la dentición adulta, sugiriendo que la personalización microbiana comienza tras la erupción de la primera dentición, pero funcionalmente, aunque los individuos muestran pocas diferencias, "el ensamblaje microbiano puede seguir un esquema definido que está impulsado por los requisitos funcionales del ecosistema" (Mason et al. 2018). En consecuencia, esto nos debe hacer preguntarnos si en el desarrollo de la periimplantitis estamos ante una subversión del microbioma o por el contrario ante una adaptación del microbioma a un microambiente cambiante. Es decir: ¿son las bacterias las promotoras de la inflamación del huésped o es la inflamación del huésped el factor determinante para cambiar la composición del microbioma? En cualquier caso, hoy en día "lo que importa no es tanto el conjunto microbiano como el acervo genético colectivo codificado y su interacción con el entorno del huésped" (Hajishengallis 2023).

En consecuencia, es importante identificar qué microorganismos diferenciales están implicados en las distintas fases de la progresión de la pérdida marginal ósea y por lo tanto en las distintas fases de la enfermedad, capaces, por tanto, de promover la respuesta inflamatoria del huésped.

Por todo ello, el presente trabajo de Tesis Doctoral pretende evaluar una superficie SLA modificada con la adición de fosfonatos en superficie en base a la pérdida ósea marginal según distintos protocolos de carga y analizar la composición de la microbiota a lo largo del tiempo en función a dicha carga.



# ***HIPÓTESIS***



### 3. HIPÓTESIS

La hipótesis general del estudio fue que el comportamiento clínico de los implantes con superficie recubierta de multifosfonato permitiría la realización de carga temprana gracias a la teórica aceleración de la regeneración ósea alrededor del implante.

Para comprobar esta hipótesis, nos planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

1. H0: La tasa de fracaso de los implantes modificados en superficie con multifosfonato después de una carga temprana es mayor que los cargados de manera convencional.

H1: La tasa de fracaso de los implantes modificados en superficie con multifosfonato después de una carga temprana es menor que los cargados de manera convencional.

2. H0: La pérdida marginal ósea alrededor de los implantes modificados con multifosfonato después de una carga temprana es mayor que los cargados de manera convencional.

H1: La pérdida marginal ósea alrededor de los implantes modificados con multifosfonato después de una carga temprana es menor que los cargados de manera convencional.

3. H0: Existen factores locales del sitio del implante que influyen en el éxito de los implantes modificados con multifosfonato después de una carga temprana o convencional.

H1: No existen factores locales del sitio del implante que influyen en el éxito de los implantes modificados con multifosfonato después de una carga temprana o convencional.

4. H0: El perfil microbiológico del surco de los implantes modificados con multifosfonato es diferente después de una carga temprana que después de la carga convencional.

H1: El perfil microbiológico del surco de los implantes modificados con multifosfonato es igual después de una carga temprana que después de la carga convencional.

# ***OBJETIVOS***



## 4. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes:

### 4.A. Objetivo general

- OG. Evaluar clínicamente la superficie de multifosfonato desde el punto de vista de su eficacia para la carga temprana del implante.

### 4.B. Objetivos específicos

- OE.1. Objetivo Específico 1: Comparar el éxito clínico y radiológico tras la carga protésica de implantes modificados en superficie con multifosfonato sometidos a carga temprana en comparación con implantes del mismo tipo sometidos a carga convencional.
- OE.2. Objetivo Específico 2: Evaluar la dinámica temporal de los cambios de nivel de hueso marginal alrededor de los implantes cargados de forma temprana o convencional.
- OE.3. Objetivo Específico 3: Valorar la posible influencia de diversos factores clínicos dependientes del sitio o del paciente en el nivel de hueso marginal alrededor de los implantes cargados de forma temprana o convencional.
- OE.4. Objetivo Específico 4: Analizar el perfil microbiológico alrededor de los implantes tratados con multifosfonato después de ser cargados de manera temprana o convencional.



# ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.A. Condicionantes éticos, diseño y localización del estudio**

El protocolo clínico se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, la Guía de investigación clínica de dispositivos médicos para seres humanos – Guía de buenas prácticas clínicas (ISO 14155:2011) y las Directrices generales de buenas prácticas clínicas (2001/20 /CE). Los resultados se informan de acuerdo con la declaración de Estándares consolidados de informes de ensayos (CONSORT). Antes del inicio de las actividades, el estudio fue evaluado por el Comité de Ética en Investigación en Humanos de la Universidad de Granada y, tras su aprobación (Anexo 1: Justificante de Aprobación Ética del Estudio, código 216/CEIH/2016), fue registrado en un Registro Primario aprobado en la Red de Registros de Ensayos Clínicos de la OMS que cumple con los requisitos del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE), en este caso la base de datos [clinicaltrials.gov](https://www.clinicaltrials.gov), con el código de estudio NCT03059108 (<https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03059108>).

Para probar nuestras hipótesis y dentro de nuestro objetivo global, se realizó un ensayo clínico controlado aleatorio de grupos paralelos para comparar diferentes protocolos de carga después del uso de implantes dentales C1, de conexión protésica tipo cónica interna, con superficie arenada y sometida a grabado ácido (tipo SLA) tratados superficialmente con multifosfonato bajo el nombre comercial B+, fabricados por la empresa MIS Implants Technologies Ltd. El diseño original del estudio planificó el seguimiento por sólo un año tras la carga protésica; sin embargo, posteriormente se consideró conveniente hacer un seguimiento adicional a más largo plazo, por lo que también se hizo una evaluación posterior transcurridos 5 años.

Para este estudio se reclutaron pacientes en la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada. Después de proporcionar toda la información relativa al estudio, objetivos, procedimientos, responsabilidades, expectativas y derechos, se pidió a los participantes que firmaran un consentimiento informado antes de pasar al proceso de selección. La inclusión en el estudio y la aleatorización se llevó a cabo antes de la cirugía. Las muestras recogidas han sido analizadas en el Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada. Los pacientes fueron incluidos entre febrero de 2017 y enero de 2019.

### **5.B. Población de estudio**

La población de estudio fue seleccionada en base a los siguientes criterios:

1. Criterios de inclusión: pacientes con edad entre 18 y 75 años a quienes les faltara un diente en el área premolar o molar del maxilar o mandíbula con dientes naturales antagonistas y adyacentes (mesial y distal).
2. Criterios de exclusión:
  - 2.1. Pacientes con necesidad de injerto óseo en el área del implante.
  - 2.2. Pacientes con algún signo clínico y/o radiográfico de enfermedad periodontal activa u otras afecciones dentales.
  - 2.3. Fumadores (>10 cigarrillos/día).
  - 2.4. Pacientes con diabetes tipo 1 o 2 no controlada (H<sub>gA1c</sub>>8).
  - 2.5. Pacientes con enfermedad autoinmune o inflamatoria conocida.
  - 2.6. Pacientes con trastornos hematológicos graves, como hemofilia o leucemia.
  - 2.7. Pacientes con infección local o sistémica que pudiera comprometer la curación normal (p. ej., patología periapical extensa).
  - 2.8. Pacientes con disfunción/insuficiencia hepática o renal.

- 2.9. Pacientes actualmente recibiendo tratamiento contra el cáncer o que lo hubiesen recibido dentro de los 18 meses anteriores a la colocación de implantes.
- 2.10. Pacientes con antecedentes de uso prolongado de bifosfonatos orales (es decir, 10 años o más) o con antecedentes de uso de bifosfonatos intravenosos.
- 2.11. Pacientes con antecedentes de uso prolongado (>3 meses) de antibióticos o medicamentos que se sabe que alteran la inflamación y/o el sistema inmunológico.
- 2.12. Pacientes con enfermedades óseas graves (por ejemplo, enfermedad ósea de Paget).
- 2.13. Mujeres embarazadas o madres lactantes.
- 2.14. Pacientes que no puedan o no quieran seguir las instrucciones relacionadas con los procedimientos del estudio.

Una vez comprobado el cumplimiento de los criterios de inclusión y que no presentaban ningún criterio de exclusión, cada paciente se sometió a un examen clínico general y dental complementado con exámenes intraorales y radiográficos específicos del sitio de la ausencia dental. Si el candidato presentaba algún signo clínico y/o radiográfico de enfermedad periodontal activa u otras afecciones dentales, fueron excluidos del estudio de forma temporal hasta recibir el tratamiento y lograr la estabilidad.

### **5.C. Procedimientos clínicos**

En la **Figura 1** se muestra un resumen gráfico de los procedimientos realizados, mientras que la **Tabla 1** muestra un detalle de los mismos, que, además, era entregado a los pacientes para su conocimiento previo de la sistemática a seguir.

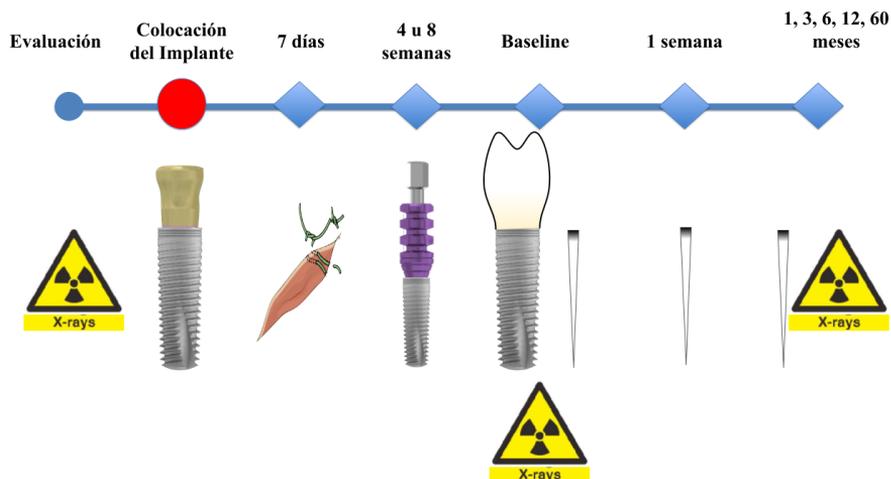


Figura 1: Representación gráfica de la temporalización del estudio y procedimientos realizados en cada visita.

Tabla 1: Resumen de los procedimientos del estudio que se realizaron en cada visita.

VISITAS	Visita 0	Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4	Visita 5	Visitas 6-10
<b>ACCIONES A REALIZAR</b>	Screening	Implante	1 semana tras Visita 1	4 u 8 semanas tras Visita 2	Baseline (14 días tras Visita 3)	1 semana tras Visita 4	1, 3, 6, 12 y 60 meses
Consentimiento Informado							
Historia clínica y dental							
Colocación del implante							
Retirada de sutura							
Impresiones							
Colocación de prótesis							
Muestras de biofilm							
Examen radiográfico							
Medidas clínicas							
<b>Duración aproximada</b>	0,5 horas	1 hora	0,5 horas	0,5 horas	1 hora	0,5 horas	1 hora

Como se observa, el protocolo clínico consistió en la inserción de un implante en la posición designada y mediante un protocolo a una sola fase, es decir, con colocación del tornillo de cicatrización en el mismo momento de la inserción del implante, con objeto de minimizar los tiempos de espera para la carga, especialmente relevante en el grupo de carga a 4 semanas. Todas las cirugías fueron realizadas por el mismo operador (PGM) y ayudante (LGG), asistidos por el resto del equipo en la toma de datos, verificados por el otro director de esta Tesis Doctoral (MPM). Para ello, se realizó una incisión supracrestal mucoperiostica de espesor total, incluidas las papilas de los dientes adyacentes, tras lo que se elevó el colgajo hasta el límite de la encía insertada en la cara vestibular y con la misma extensión por lingual. La preparación quirúrgica del lecho implantario se realizó siguiendo el protocolo de colocación del implante C1 establecido por la empresa fabricante del mismo (MIS Implants Technologies Ltd., Bar Lev Industrial Park, Israel), terminando siempre con la fresa final del sistema, que era de un solo uso. La preparación con todas las fresas se realizó a una velocidad de 1200 rpm bajo irrigación profusa de solución salina estéril con un torque máximo de 55 Ncm. A continuación, se insertaron los implantes C1 con superficie recubierta de multifosfonato (B+, MIS Implants Technologies Ltd.) con pieza de mano y motor a un torque máximo de inserción de 55 Ncm. En aquellos casos en que fue necesario, se finalizó con llave de carraca, siempre con torque inferior a 80 Ncm. Finalmente, el colgajo se suturó cuidadosamente con seda quirúrgica 4/0 (Laboratorios Aragón, Barcelona, España), incluyendo además de la sutura de la incisión crestral, un punto en cada papila adyacente.

La asignación de grupo se realizó tras la colocación del implante y reposición de los tejidos, con objeto de proporcionar ciego al operador quirúrgico. Cada implante se asignó aleatoriamente a uno de los 2 grupos: **Control** (carga convencional comenzando con la toma de impresiones 8 semanas tras la colocación del implante) o **Test** (carga temprana comenzando con la toma de

impresiones 4 semanas tras la colocación del implante). Según la asignación, al momento designado se tomaron impresiones dentales y se enviaron al laboratorio protésico para la fabricación de una corona atornillada de metal-cerámica sobre un aditamento Ti-Base (MIS Implants Technologies Ltd.) de 1,5 o 3 mm de altura, según el grosor de la mucosa periimplantaria. La corona se colocó dos semanas después, aplicando el torque recomendado por la empresa de 30 Ncm y realizando en boca los ajustes oclusales necesarios para evitar sobrecargas.

En todas las visitas se realizó algún tipo de registro y toma de muestras o radiografías como se explica a continuación.

#### **5.D. Mediciones clínicas**

Los datos clínicos registrados fueron los siguientes:

- En el momento de la colocación del implante:
  - Distancia mesio-distal entre los dientes adyacentes.
  - Altura oclusal.
  - Ancho vestibulo-lingual de la cresta (antes y después del levantamiento del colgajo).
  - Ancho de la mucosa queratinizada, que también se registró en el momento de la toma de impresiones y la colocación de la prótesis.
  - Grosor vertical de la mucosa periimplantaria, que también se registró en el momento de la toma de impresiones.
  - Índice de cicatrización (Morelli et al. 2011) hasta la entrega de la prótesis:
    - 0 = Cicatrización madura de la herida.
    - 1 = Eritema.
    - 2 = Sangrado.
    - 3 = Movilidad del colgajo.

- 4 = Supuración.
- 5 = Necrosis.
- Desde la colocación de la prótesis hasta el seguimiento final:
  - Ancho de la mucosa queratinizada.
  - Índice de papila (Jemt 1997):
    - 0 = Sin papila.
    - 1 = <50% de relleno del área interproximal.
    - 2 = ≥50% de relleno del área interproximal.
    - 3 = Papila ideal.
    - 4 = Sobrecrecimiento.

Finalmente, en la visita a 5 años se registró también un cuestionario de satisfacción global en escala 1 a 10, siendo el 1 = La peor experiencia y mínima satisfacción y el 10 = Experiencia totalmente satisfactoria.

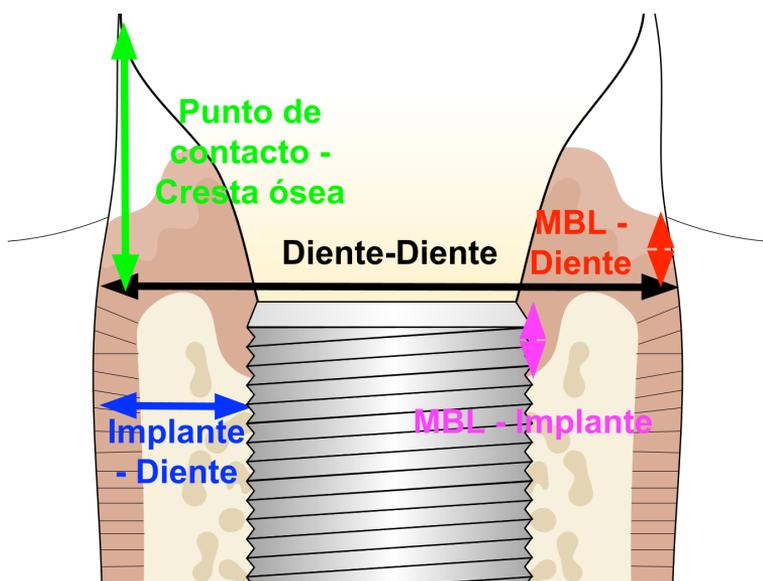
### **5.E. Examen radiológico y mediciones**

Se obtuvieron imágenes radiográficas periapicales estandarizadas del área en el momento de la colocación del implante, colocación de la prótesis, y a los 3, 6, 12 y 60 meses. Las medidas lineales del hueso marginal y los cambios a lo largo del tiempo se midieron por parte de un mismo operador experimentado (MPM) utilizando el software Image J (NIH, Bethesda, EE. UU.) tomando como referencia la unión cemento-esmalte en los dientes adyacentes o el hombro del implante. Para ello, en primer lugar, todas las imágenes fueron calibradas internamente según el diámetro del implante, ya que éste siempre fue visible en la radiografía, no así la longitud. En el caso de los implantes, se registraron valores positivos cuando el hueso estaba coronal al hombro, mientras que se registraron valores negativos cuando el hueso estaba apical al punto de referencia.

Los datos registrados en cada tiempo, como se indica en la **Figura 2**, fueron:

- Distancia entre dientes.

- Distancia implante-diente anterior e implante-diente posterior.
- Longitud de la corona.
- Ratio corona-implante, a partir de la anterior sumada a la altura del aditamento transmucoso Ti-Base y la longitud del implante.
- Distancia desde el límite amelo-cementario a la cresta ósea en el diente anterior y el diente posterior.
- Nivel óseo marginal del implante (MBL) por mesial y por distal, a partir de los cuáles se calculó el valor promedio.
- Cambio en el nivel óseo marginal del implante por mesial y por distal (y promedio) desde la colocación del implante hasta el momento de la carga.
- Cambio en el nivel óseo marginal del implante por mesial y por distal (y promedio) desde la carga hasta el seguimiento a 1 año.
- Cambio en el nivel óseo marginal del implante por mesial y por distal (y promedio) desde la carga hasta el seguimiento a 5 años.



**Figura 2:** Representación gráfica de las diferentes medidas realizadas en las radiografías periapicales de cada implante.

## **5.F. Biofilm intrasulcular**

### **5.F.1. Obtención de muestras**

La toma de muestras de biofilm intrasulcular se realizó de forma convencional. Para ello, en primer lugar, se eliminó el exceso de saliva mediante un eyector y se aisló el área con rollos de algodón. A continuación, se recogió la muestra de biofilm insertando una punta de papel esterilizada en el surco periimplantario y de los dientes adyacentes durante 30 segundos. Inmediatamente después se transfirió la tira de papel a un tubo Eppendorf y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento y análisis.

### **5.F.2. Extracción de ADN**

La extracción de ADN de las puntas de papel se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de extracción de ADN, DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden Alemania). Este kit está diseñado para la extracción de ADN de muestras de tejido y sangre. Permite la purificación de ADN genómico de alta calidad para su posterior aplicación en investigación molecular. El protocolo de extracción, de forma resumida, consistió en:

1. Lisis de las muestras: Se colocó cada punta de papel en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, se añadió 180  $\mu\text{l}$  del tampón de lisis (tampón ATL (Qiagen)) y 20  $\mu\text{l}$  de Proteinasa K. Se aplicó un vortex durante 15 segundos y seguidamente se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 200  $\mu\text{l}$  de tampón AL (Qiagen) a la muestra y se incubó 1 hora a  $56^{\circ}\text{C}$ , tras lo que se añadió 300  $\mu\text{l}$  de etanol  $100^{\circ}$ .
2. Unión del ADN a la columna: La mezcla del lisado+etanol se incorporó en una columna DNeasy Mini spin, donde el ADN se une a una membrana de sílice bajo condiciones específicas. Se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 segundos.

3. Lavado de la columna: Se realizó un lavado con 500 µl de tampón AW1 y se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 segundos. Se eliminó el filtrado del primer lavado. Seguidamente, se realizó un segundo lavado con el tampón AW2 y se centrifugó durante 2 minutos a 13,000 rpm.
4. Elución del ADN: El ADN purificado se eluyó de la columna DNeasy Mini spin a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml añadiendo 50 µl de tampón AE y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 minuto. Se almacenó el ADN obtenido a -20°C hasta su posterior uso a corto plazo.
5. Finalmente se cuantificó la concentración y calidad del ADN que fue determinada utilizando el kit de ensayo Qubit dsDNA HS con el fluorómetro QubitTM3 y NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) con unas ratios de 260/280 ~ 1,8. La integridad del ADN se analizó en la estación LabChip GX2.

#### 5.F.3. Construcción y cuantificación de librerías de DNA

Utilizamos el kit de librerías Illumina DNA PREP (Illumina, San Diego, California, EE. UU.). Este kit facilita la construcción de librerías de ADN para su posterior secuenciación en las plataformas de Illumina y, en nuestro caso, en Nextseq 2000.

El protocolo general del kit incluye la fragmentación del ADN, la reparación de extremos, la adición de adaptadores de secuenciación específicos de Illumina, la amplificación mediante PCR, la limpieza de las librerías donde se purifican las librerías amplificadas y Pool de librerías. Brevemente, siguiendo las recomendaciones del fabricante se siguió el protocolo de Illumina DNA Prep (Document 1000000025416 v09), según el cual:

1. El ADN se tagmentó con transposomas unidos a perlas magnéticas. La reacción de tagmentación se detuvo con un tampón de parada (TSB) antes de proceder a la limpieza utilizando el tampón de lavado (TWB). A este paso le siguieron 5 ciclos de amplificación del ADN

tagmentado con PCR Mix y los adaptadores de índice. Se utilizaron los índices Nextera DNA CD (Illumina). Las bibliotecas se limpiaron utilizando las perlas de purificación, seguido de dos lavados con etanol 80% y se eluyeron en 32  $\mu$ l de tampón de resuspensión (RSB).

2. A continuación, las bibliotecas se cuantificaron utilizando el kit de ensayo de alta sensibilidad Qubit dsDNA en Qubit<sup>TM</sup>3 (Thermo Fisher Scientific). Cada biblioteca de muestras se normalizó a concentraciones de 2 nM. El pool de bibliotecas de 650 pM se unió con control PhiX al 1 % (PhiX Control v3) y se secuenció en una plataforma Illumina NextSeq 2000 (Illumina), utilizando una flow cell P1 de 300 ciclos.

#### 5.F.4. Análisis de datos

Los datos brutos obtenidos de la secuenciación fueron volcados a la plataforma BaseSpace Sequence Hub (Illumina) en donde son automáticamente clasificados según secuencias FASTQ y sometidos a un control de calidad. A continuación, se empleó la aplicación DRAGEN Metagenomics Pipeline para la clasificación taxonómica empleando el sistema Kraken 2. Los datos obtenidos fueron analizados para la eliminación de todas las secuencias correspondientes a órdenes taxonómicos no bacterianos y empleados para la generación de gráficas de jerarquía taxonómica Krona, convertidos a abundancias relativas en Microsoft Excel<sup>®</sup> para Mac OS y empleados para generación de gráficas de abundancia relativa y para los análisis estadísticos comparativos entre tiempos mediante Graphpad Prism 7 para MacOS.

#### **5.G. Medida de resultado primaria**

La medida de resultado primaria fue el nivel óseo marginal alrededor del implante tras 1 año de carga, utilizando como medida de éxito lo definido por la Conferencia de Consenso de Pisa (Misch et al. 2008). El resto de parámetros

fueron considerados como medidas de resultado secundarias para la realización de los análisis de co-variables correspondientes.

### **5.H. Tamaño de la muestra**

El estudio actual se clasificó como un estudio piloto ya que no se habían publicado estudios clínicos previos comparativos del protocolo de carga sobre implantes con la superficie en estudio. Decidimos establecer el tamaño de la muestra en 34 pacientes como base para detectar posibles diferencias en la variable primaria, o al menos, para estimar el tamaño de la muestra para futuros estudios.

### **5.I. Ciego**

Aunque ni el paciente ni el dentista restaurador pudieron ser enmascarados a la asignación de grupo debido al protocolo de carga, tanto el operador quirúrgico como otros miembros del equipo a cargo de la exploración y seguimiento de los pacientes, así como el analista de datos sí estaban cegados al grupo de asignación.

### **5.J. Aleatorización**

Debido al reducido tamaño muestral, con objeto de evitar el desequilibrio entre grupos en términos de género, ubicación del diente ausente y tipo de hueso, se realizó una aleatorización restringida mediante un protocolo de minimización utilizando un software diseñado para este propósito (Saghaei & Saghaei 2011). Con esto se pretendía maximizar el poder estadístico y la generalización de los hallazgos del estudio. Un miembro del personal de la clínica que no participó en el ensayo clínico fue el encargado de realizar la asignación.

### **5.K. Análisis estadístico**

Con objeto de maximizar la utilidad de los datos obtenidos, se realizó un análisis “*intention-to-treat*” en el que se analizaron todos los datos obtenidos independientemente de las ausencias de datos individuales o el cumplimiento

del seguimiento de pacientes concretos. Para cada tipo de variable se calcularon porcentajes, medias y desviaciones estándar, según si eran datos categóricos o continuos. Los datos categóricos se evaluaron con la prueba de chi-cuadrado mientras que, debido al tamaño de la muestra, las medidas de resultado continuas primarias y secundarias se analizaron mediante la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon y un modelo lineal general para análisis a lo largo del tiempo con comparaciones por pares evaluadas adicionalmente mediante contrastes de Tukey para los datos radiográficos. Para estos análisis se utilizó el software R (versión 3,6,2) (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Las comparaciones de abundancia relativa de los diferentes microorganismos entre tiempos se realizaron mediante una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para un factor (tiempo) y ajustes de Bonferroni para comparaciones múltiples por pares, utilizando el software IBM® SPSS® 28,0 para Mac OS (IBM Corporation, Armonk, Nueva York, EE. UU.). La significación estadística se fijó en valores  $p < 0,05$ .

La representación gráfica de algunas variables se realizó con R (versión 3,6,2) (The R Foundation for Statistical Computing), mientras que otras se han representado mediante Microsoft® Excel para Mac OS 16,35 y Graphpad Prism 7 para Mac OS.



# ***RESULTADOS***



## 6. RESULTADOS

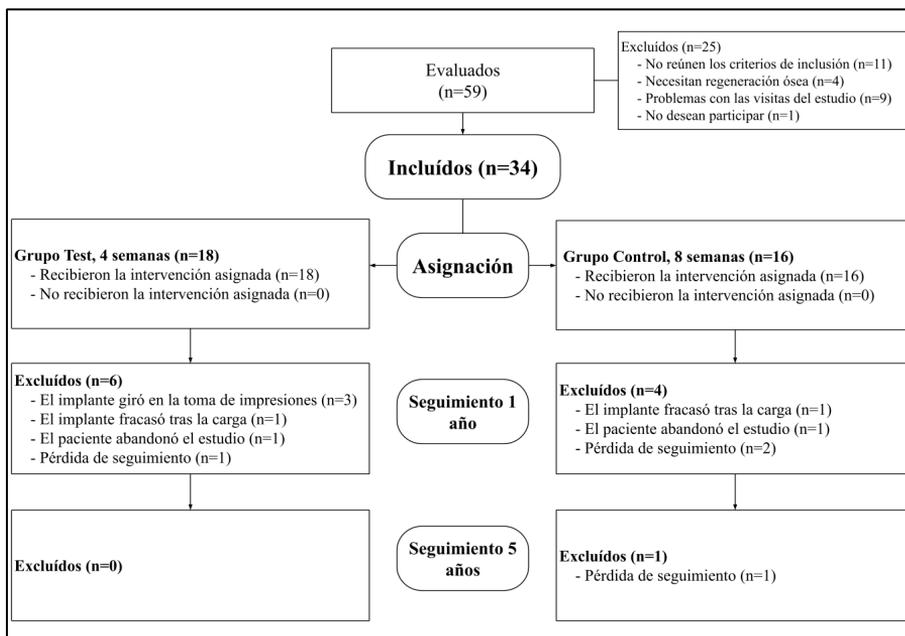
### 6.A. Población de estudio

Para el presente estudio se evaluaron un total de 59 pacientes para su inclusión, de los cuáles 34 cumplieron con los criterios de inclusión y no presentaban ningún criterio de exclusión, por lo que decidieron participar en el estudio. De ellos, 18 fueron asignados al grupo de Test (impresiones para prótesis sobre implante 4 semanas después de su colocación) y 16 fueron asignados al grupo Control (impresiones para prótesis sobre implante 8 semanas después de su colocación).

Como se muestra en la **Figura 3**, al año de seguimiento se evaluaron 12 pacientes en cada grupo. En el grupo Test, 3 pacientes no fueron analizados ya que, al momento de la toma de impresiones, el implante giró al no estar correctamente integrado; en estos casos, se decidió dejar el implante en su sitio para intentar la carga tiempo más tarde, aunque los pacientes fueron excluidos del estudio. El resto de pacientes no incluidos se debieron a fracaso tras la carga, abandono del estudio y pérdida de seguimiento. Concretamente en un paciente tras 3 meses en función, se retiró el implante que generaba dolor y presentaba movilidad; el paciente fue rehabilitado posteriormente sin participar en el estudio. Otro paciente decidió voluntariamente no continuar en el estudio tras la visita de 6 meses. El último paciente no asistió a la visita planificada ni respondió a los contactos realizados por todos los medios disponibles (correo electrónico y teléfono).

De forma similar, en el grupo Control un total de 4 pacientes no fueron analizados. Concretamente un implante fracasó también tras 3 meses en función, otro paciente decidió voluntariamente no continuar en el estudio y dos pacientes no asistieron a la visita planificada ni respondieron a los contactos realizados por todos los medios disponibles.

La evaluación a 5 años se realizó sobre prácticamente el mismo número de pacientes ya que sólo uno del grupo Control no pudo ser localizado.



*Figura 3: Diagrama CONSORT de los pacientes evaluados, incluidos, aleatorizados y evaluados en el tiempo.*

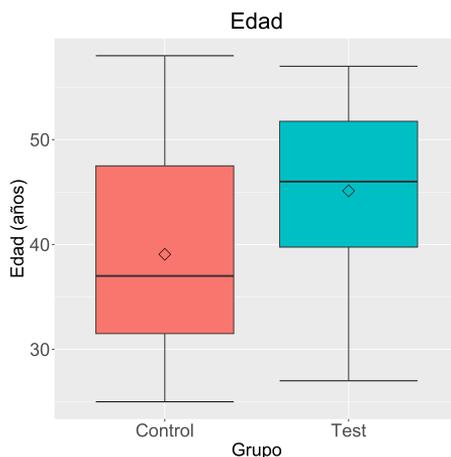
Debido al hecho de que, a 5 años, la posible influencia del tipo de carga en los resultados finales era previsiblemente muy reducida y a que la publicación inicial se realizó sólo con los resultados del seguimiento a 1 año, se presentarán a continuación los resultados por separado.

## 6.B. Resultados a 1 año

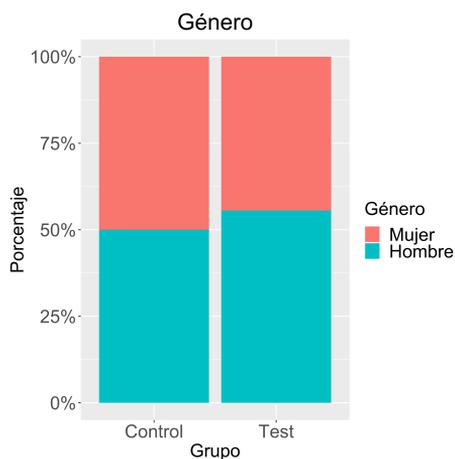
### 6.B.1. Resultados clínicos

De los pacientes incluidos, la edad media fue de 39 años (mínimo de 25, máximo de 58) en el grupo Control y 45 años (con un mínimo de 27 y máximo de 57) en el grupo Test (**Figura 4**). La diferencia de edad no fue estadísticamente significativa ( $p=0,067$ ; prueba de suma de rangos de Wilcoxon). Ocho participantes en cada grupo eran mujeres ( $p=0,746$ ; prueba

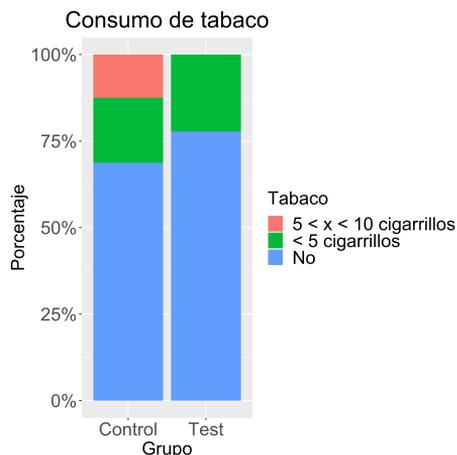
de chi-cuadrado) (**Figura 5**). La mayoría de ellos no eran fumadores (**Figura 6**) y ninguno consumía alcohol de forma habitual. Tampoco ninguno de ellos informó sobre ninguna enfermedad sistémica. Respecto al sitio del implante, el principal motivo de extracción dental, en ambos grupos, fue la presencia de caries extensa no restaurable y estaban localizados, mayoritariamente, en la posición del primer y segundo premolar superior.



**Figura 4:** Diagrama de caja representando la distribución de la edad. El rombo indica la media.

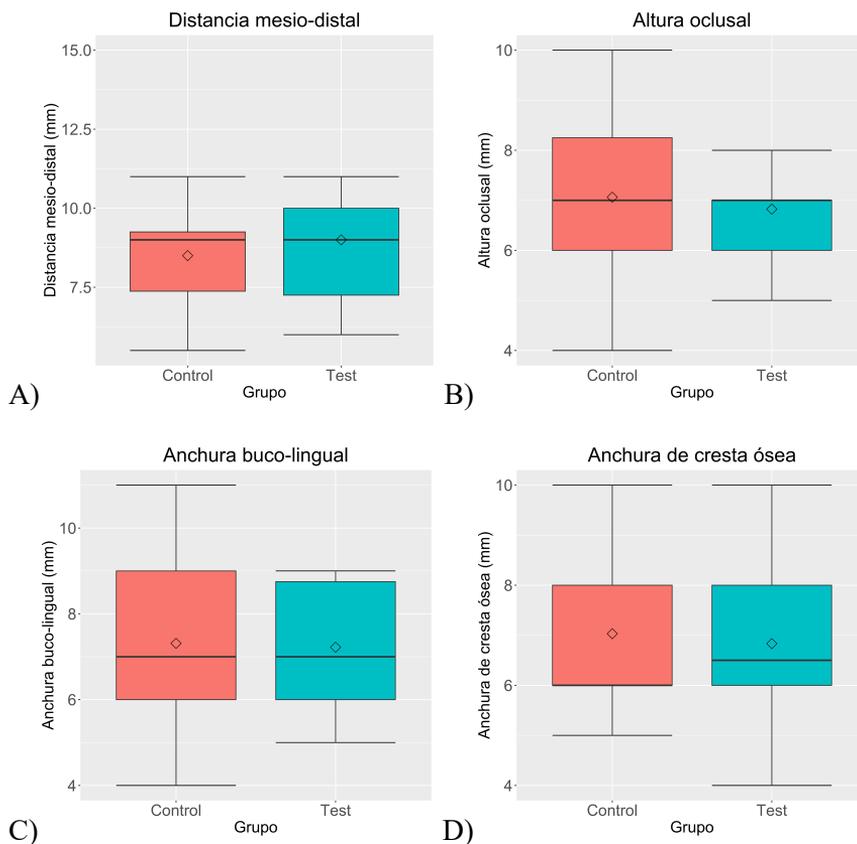


**Figura 5:** Representación de los porcentajes de mujeres y hombres por grupo.

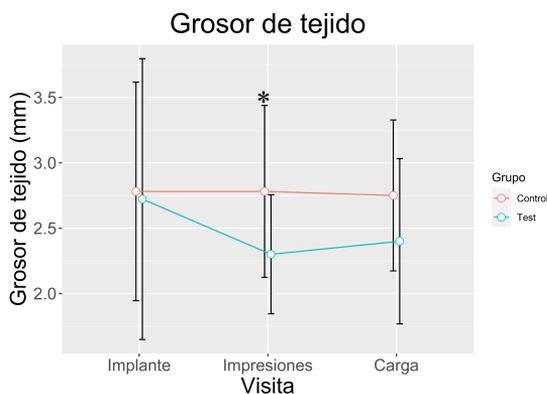


**Figura 6:** Distribución porcentual del consumo de tabaco entre los participantes en el estudio.

Ninguna de las mediciones clínicas basales respecto al sitio del implante fue diferente entre grupos al momento de colocación de los implantes, incluyendo la distancia mesio-distal, altura oclusal, anchura buco-lingual antes y después de levantar el colgajo (**Figura 7**), o grosor de mucosa periimplantaria en el momento de colocación del implante (**Figura 8**), lo que confirmó la comparabilidad inicial de ambos grupos.

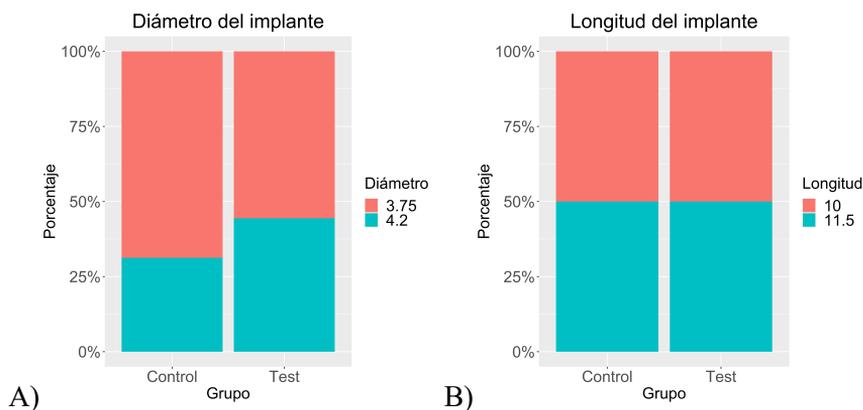


**Figura 7:** Diagramas de caja representando la distribución de la A) distancia mesio-distal, B) altura oclusal, C) anchura buco-lingual y D) anchura de la cresta ósea. El rombo indica la media.



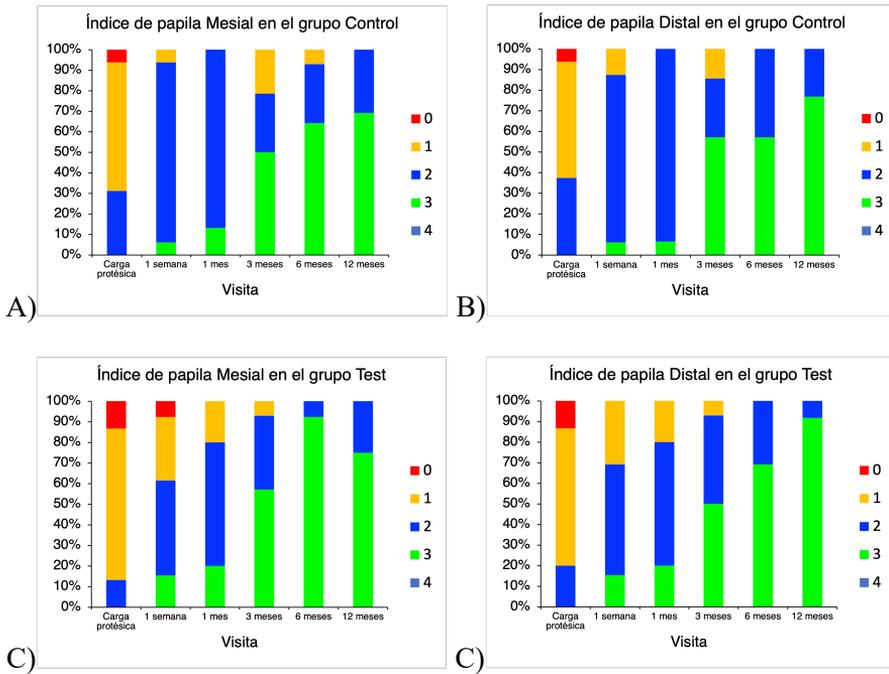
**Figura 8:** Representación gráfica del grosor de tejido en las distintas visitas en que se evaluó. Hubo diferencias significativas entre grupos en las mediciones realizadas en el momento de la toma de impresiones (\*:  $p=0,012$ ).

No hubo diferencias en las dimensiones de los implantes que se colocaron, que fueron en su gran mayoría de 3,75 mm de diámetro, tanto de 10,0 como de 11,5 mm de longitud (**Figura 9**). Obviamente, el tiempo real transcurrido desde la colocación del implante hasta la toma de impresiones, así como desde la colocación del implante hasta la colocación de la prótesis fue diferente en ambos grupos.



**Figura 9:** Distribución por grupos de los distintos A) diámetros y B) longitudes de implante empleadas.

El grosor de la mucosa periimplantaria en el momento de la toma de impresiones fue menor en el grupo Test, de forma estadísticamente significativa (2,78 (0,66) mm vs. 2,30 (0,46) mm para los grupos Control y Test, respectivamente;  $p=0,012$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon) (**Figura 8**). Por este motivo, la altura del aditamento transmucoso Ti-Base fue también menor en ese grupo (50% vs. 86,7% de 1,50 mm en los grupos Control y Test, respectivamente;  $p=0,029$ , prueba chi-cuadrado). El resto de variables a lo largo del tiempo, así como los índices de papila, tanto mesial como distal, no mostraron diferencias significativas en ninguno de los momentos en que fueron registradas. Sí se detectó una mejora en el índice de papila con el tiempo, llegando a ser, a 12 meses, ideal en la mayoría de los casos (**Figura 10**).



*Figura 10: Índice de papila mesial y distal para cada grupo y momento temporal.*

Todos los datos de las variables clínicas se presentan de forma detallada en la **Tabla 2**.



**Tabla 2:** Descripción y comparación de las variables clínicas de los pacientes incluidos en el estudio y hasta 1 año de la carga protésica.

	<b>Grupo Control</b> (Impresiones dentales 8 semanas después de la colocación del implante) <b>n=16 (47,06%)</b>	<b>Grupo Test</b> (Impresiones dentales 4 semanas después de la colocación del implante) <b>n=18 (52,94%)</b>	<b>Valor p</b> *
<b>Edad</b> [media (min, max)] (años)	42 (25, 58)		
	39 (25 - 58)	45 (27 - 57)	0,067
<b>Género</b> (%)			
Mujer	50,0	44,4	0,746
Hombre	50,0	55,6	
<b>Consumo de tabaco</b> (%)			
No	68,8	77,8	0,302
Bajo (<5 cigarrillos/día)	18,8	22,2	
Bajo (>5, <10 cigarrillos/día)	12,5	0,0	
<b>Distancia mesio-distal</b> [media (DE)] (mm)	8,50 (1,45)	9,00 (2,22)	0,527
<b>Altura oclusal</b> [media (DE)] (mm)	7,06 (1,78)	6,82 (1,19)	0,645
<b>Anchura buco-lingual</b> [media (SD)] (mm)			
Antes de abrir colgajo	7,31 (2,12)	7,22 (1,35)	0,888
Después de abrir colgajo	7,03 (1,51)	6,83 (1,72)	0,736
<b>Diámetro del implante</b> (%)			
3,75 mm	68,8	55,6	0,429
4,20 mm	31,2	44,4	
<b>Longitud del implante</b> (%)			
10,0 mm	50,0	50,0	1
11,5 mm	50,0	50,0	
<b>Días transcurridos desde la colocación del implante hasta la toma de impresiones</b> [media (DE)]	59,38 (4,73)	29,67 (3,53)	<0,001 *
<b>Días transcurridos desde la colocación del implante hasta la carga protésica</b> [media (DE)]	73,63 (8,14)	45,07 (3,47)	<0,001 *
<b>Altura del pilar</b> (%)			0,029 *

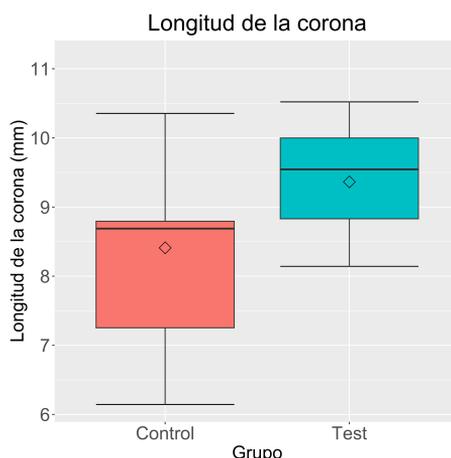
	<b>Grupo Control</b> (Impresiones dentales 8 semanas después de la colocación del implante) <b>n=16 (47,06%)</b>				<b>Grupo Test</b> (Impresiones dentales 4 semanas después de la colocación del implante) <b>n=18 (52,94%)</b>				<b>Valor p</b> <b>*</b>
1,50 mm	50,0				86,7				
3,00 mm	50,0				13,3				
<b>Grosor de mucosa periimplantaria</b> [media (DE)] (mm)									
Colocación de implante	2,78 (0,84)				2,72 (1,07)				0,911
Impresiones	2,78 (0,66)				2,30 (0,46)				0,012 *
Carga protésica	2,75 (0,58)				2,40 (0,63)				0,084
<b>Índice de papila [% por cada visita] (MESIAL) **</b>	0	1	2	3	0	1	2	3	
Carga protésica	6,2	62,5	31,2	0,0	13,3	73,3	13,3	0,0	0,441
1 semana tras la carga	0,0	6,2	87,5	6,2	7,7	30,8	46,2	15,4	0,107
1 mes tras la carga	0,0	0,0	86,7	13,3	0,0	20,0	60,0	20,0	0,140
3 meses tras la carga	0,0	21,4	28,6	50,0	0,0	7,1	35,7	57,1	0,555
6 meses tras la carga	0,0	7,1	28,6	64,3	0,0	0,0	7,7	92,3	0,202
12 meses tras la carga	0,0	0,0	30,8	69,2	0,0	0,0	25,0	75,0	0,748
<b>Índice de papila [% por cada visita] (DISTAL) **</b>	0	1	2	3	0	1	2	3	
Carga protésica	6,2	56,2	37,5	0,0	13,3	66,7	20,0	0,0	0,508
1 semana tras la carga	0,0	12,5	81,2	6,2	0,0	30,8	53,8	15,4	0,284
1 mes tras la carga	0,0	0,0	93,3	6,7	0,0	20,0	60,0	20,0	0,079
3 meses tras la carga	0,0	14,3	28,6	57,1	0,0	7,1	42,9	50,0	0,670
6 meses tras carga	0,0	0,0	42,9	57,1	0,0	0,0	30,8	69,2	0,516
12 meses tras carga	0,0	0,0	23,1	76,9	0,0	0,0	8,3	91,7	0,315

\*: Valor p: prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon en variables continuas y prueba de chi-cuadrado en variables categóricas.

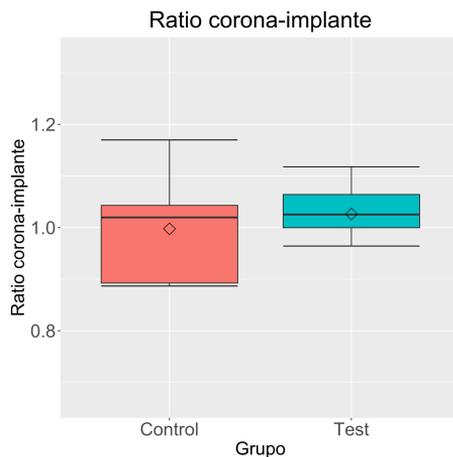
\*\* : No hubo casos de índice de papila superior a 3, motivo por el que no se incluye esa categoría en la tabla de datos.

### 6.B.2. Resultados radiográficos

En cuanto a las mediciones radiográficas, no se encontraron diferencias entre grupos en ninguna de las mediciones realizadas, ni a nivel de diente ni a nivel de implante, salvo la longitud de la corona, que fue mayor en el grupo Test (8,41 (1,26) mm vs. 9,36 (0,78) mm para los grupos Control y Test, respectivamente;  $p=0,015$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon) (**Figura 11**). Esto concuerda con la mayor utilización en este grupo de aditamentos Ti-Base más cortos para conseguir alcanzar la altura oclusal. Consecuentemente, las proporciones corona-implante no difirieron (1,00 (0,15) vs. 1,03 (0,07) para los grupos Control y Test, respectivamente;  $p=0,423$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon) (**Figura 12**).

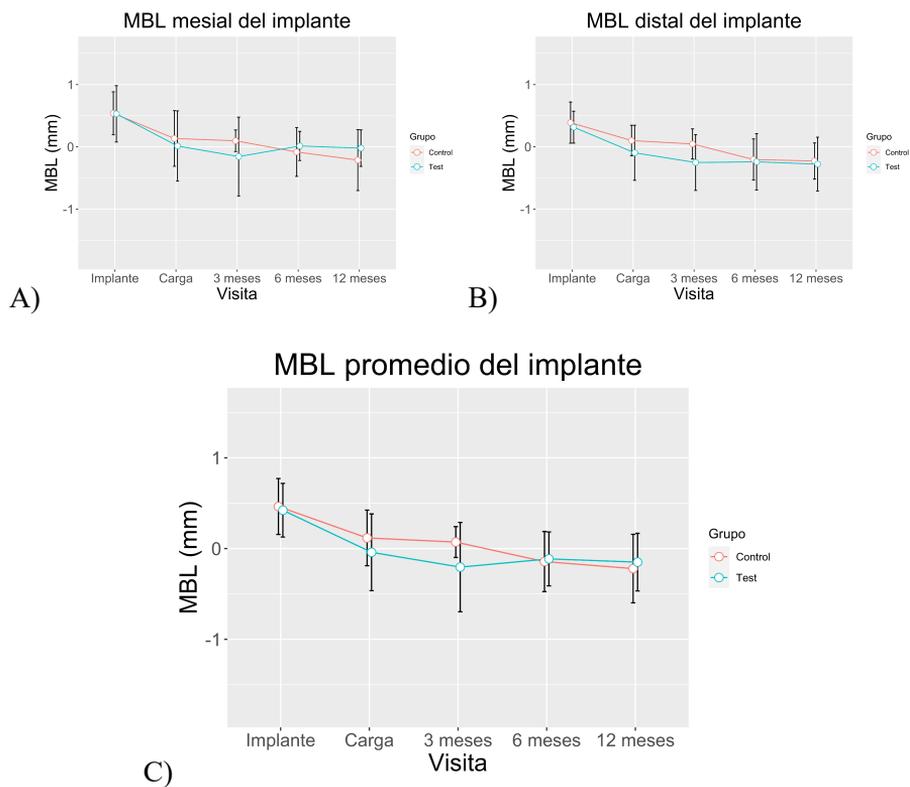


**Figura 11:** Diagrama de caja representando la distribución de la longitud de la corona medida radiográficamente. El rombo indica la media. La diferencia entre grupos fue estadísticamente significativa ( $p=0,015$ ).



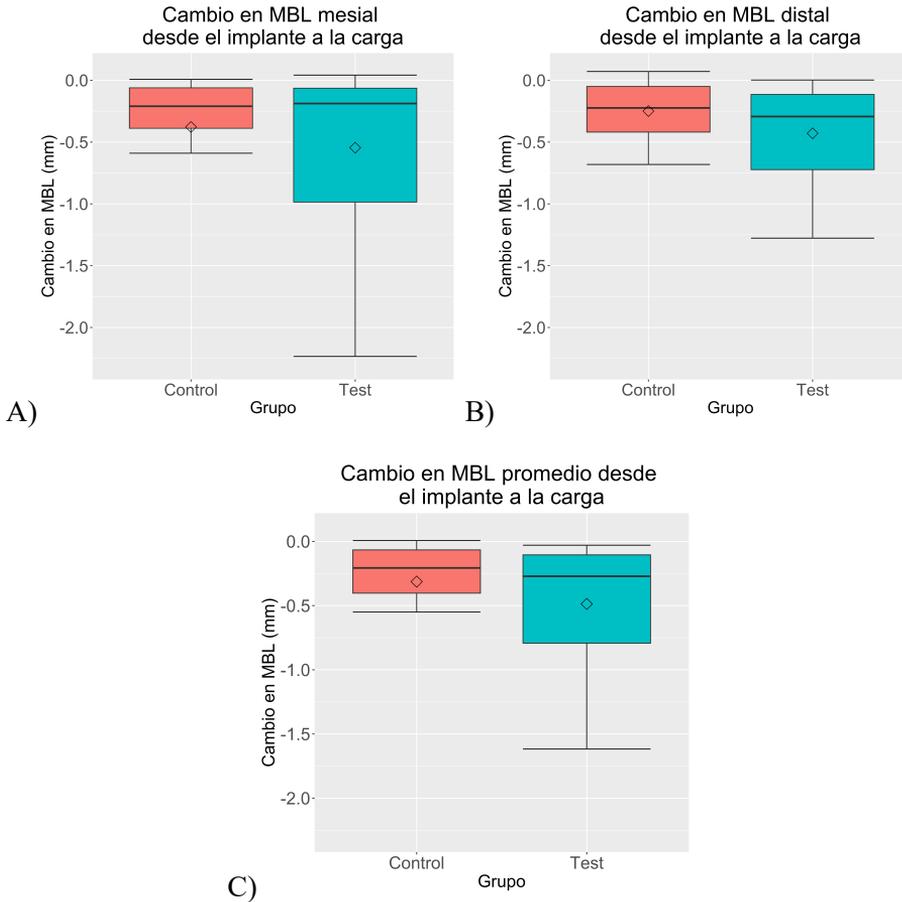
**Figura 12:** Diagrama de caja representando el ratio corona-implante, considerando la corona como la suma de la altura del aditamento transmucoso Ti-Base y la longitud de la corona. El rombo indica la media.

Dentro de cada grupo, el nivel marginal óseo entre mesial y distal no fue estadísticamente diferente en ninguna de las visitas. Por este motivo, se decidió utilizar el nivel marginal óseo promedio para los análisis de correlación. Valorado detalladamente este valor, entre la colocación del implante y la colocación de la prótesis, es decir, la fase que corresponde a la remodelación posquirúrgica, el nivel marginal óseo promedio fue significativamente diferente: se pasó de 0,46 (0,31) mm a 0,12 (0,31) mm en el grupo Control ( $p < 0,001$ ; prueba de suma de rangos de Wilcoxon); en el grupo Test el cambio fue desde 0,42 (0,30) mm en la colocación del implante a -0,04 (0,42) mm en la colocación de prótesis ( $p < 0,001$ ; prueba de suma de rangos de Wilcoxon) (**Figura 13**).



**Figura 13:** Representación del nivel marginal óseo A) mesial, B) distal y C) promedio del implante a lo largo del tiempo por grupo.

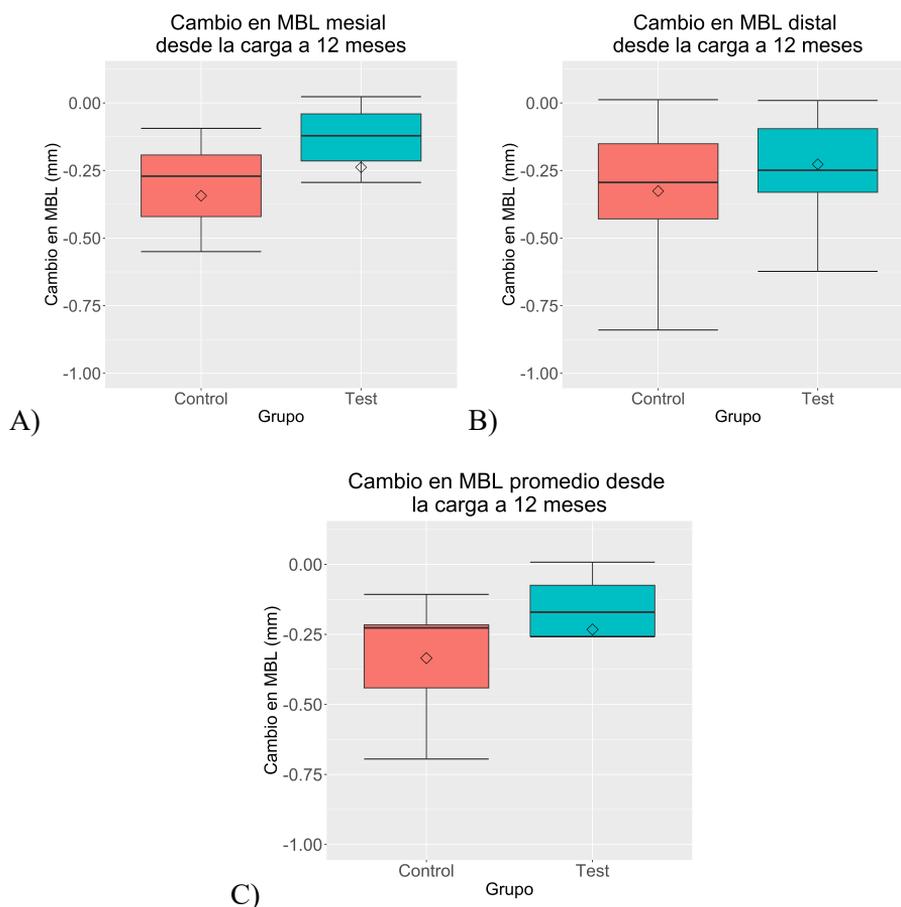
Específicamente, la magnitud promedio del cambio desde la colocación del implante hasta la carga fue de -0,31 (0,38) mm en el grupo Control frente a -0,48 (0,51) mm en el grupo Test (**Figura 14**).



**Figura 14:** Diagramas de caja representando el cambio de MBL desde la colocación del implante hasta el momento de la carga protésica en A) mesial, B) distal y C) el promedio. El rombo indica la media.

Por otro lado, el cambio promedio de nivel marginal óseo desde la carga hasta el seguimiento a los 12 meses fue de  $-0,33$  ( $0,21$ ) mm vs.  $-0,23$  ( $0,23$ ) mm para los grupos Control y Test, respectivamente; nuevamente, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,261$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon) (**Figura 15**). En particular, al año de seguimiento las diferencias en el nivel marginal óseo entre los grupos Control y Test no fueron significativas ni en el lado mesial ( $-0,21$  ( $0,49$ ) mm vs.  $-0,02$  ( $0,29$ ) mm;  $p=0,175$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon), en el lado distal ( $-0,23$  ( $0,29$ ) mm vs.  $-0,28$  ( $0,43$ ) mm;  $p=0,773$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon) ni el promedio

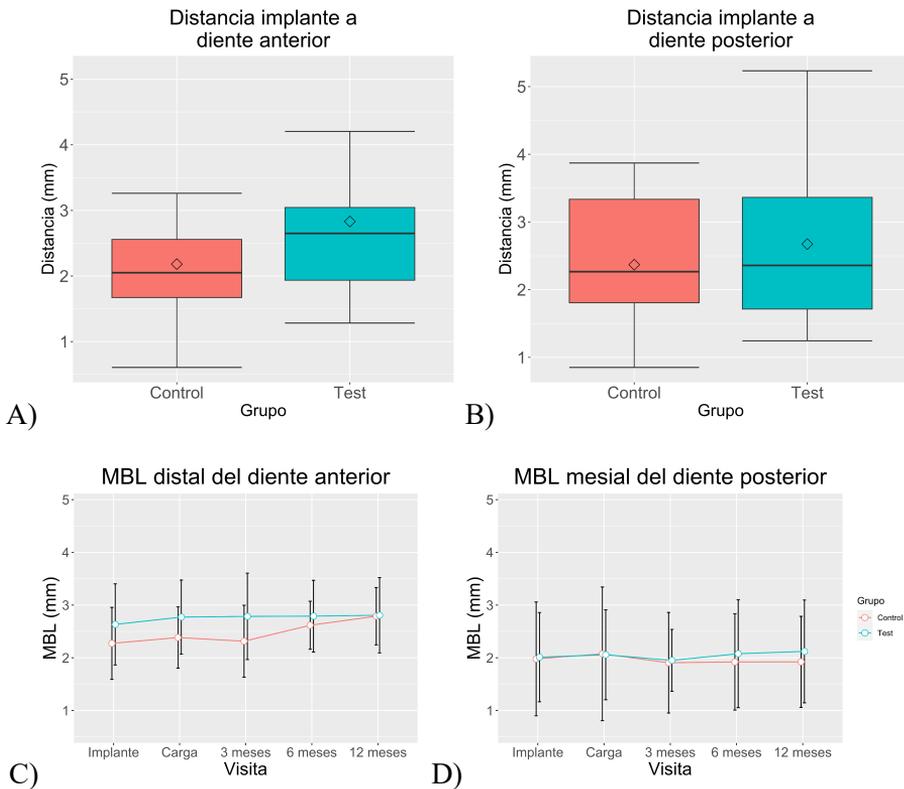
(-0,22 (0,37) mm vs. -0,15 (0,32) mm;  $p=0,443$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon) (**Figura 13**).



**Figura 15:** Diagramas de caja representando el cambio de MBL desde la carga protésica a la visita de seguimiento de 12 meses en A) mesial, B) distal y C) el promedio. El rombo indica la media.

Por ello, al analizar de forma conjunta mediante un modelo lineal general para análisis a lo largo del tiempo de las diferencias intra-grupo con comparaciones por pares evaluadas adicionalmente mediante contrastes de Tukey, se observó que las únicas comparaciones significativas se dieron entre los distintos tiempos y el momento de la colocación del implante, pero las comparaciones entre el resto de tiempos entre sí no mostraron esas diferencias.

Por último, también se analizaron datos relativos a los dientes adyacentes, tanto la distancia entre el implante y el diente anterior y posterior como los niveles óseos en distal del diente anterior y mesial del diente posterior (**Figura 16**). Ninguno de estos valores fue diferente entre grupos ni cambió significativamente a lo largo del tiempo.



**Figura 16:** Diagramas de caja representando la distancia del A) diente anterior a mesial del implante y B) del diente posterior a distal del implante. El rombo indica la media. También se representa la evolución del nivel óseo en C) distal del diente anterior y D) mesial del diente posterior.

El modelo lineal general encontró que ninguna de las variables clínicas o radiológicas evaluadas tuvo influencia significativa en el nivel marginal óseo en ninguna visita o grupo.

Es importante reseñar que se registraron signos de mucositis en 2 pacientes en el grupo de Control y 1 en el grupo Test en el seguimiento a los 3 y 6 meses,

respectivamente. La comprobación radiográfica demostró que no había pérdida ósea relevante. La retirada de la corona, irrigación con clorhexidina y las instrucciones de higiene resolvieron el cuadro sin mayores consecuencias.

Todas las mediciones radiográficas se encuentran detalladas en la **Tabla 3**.



**Tabla 3:** Descripción y comparación de variables radiográficas (media (DE)) en mm, excepto relación corona-implante, de los pacientes incluidos en el estudio y hasta 1 año de la carga protésica.

	<b>Grupo Control</b> (Impresiones dentales 8 semanas después de la colocación del implante)	<b>Grupo Test</b> (Impresiones dentales 4 semanas después de la colocación del implante)	<b>Valor p</b> *
<b>Distancia implante - diente anterior</b>	2,18 (1,00)	2,83 (1,09)	0,143
<b>Distancia implante - diente posterior</b>	2,37 (1,00)	2,67 (1,19)	0,576
<b>Longitud de la corona</b>	8,41 (1,26)	9,36 (0,78)	0,015 *
<b>Ratio corona - implante</b>	1,00 (0,15)	1,03 (0,07)	0,423
<b>Nivel óseo marginal por distal del diente anterior</b>			
Colocación de implante	2,27 (0,68)	2,63 (0,77)	0,143
Carga protésica	2,38 (0,58)	2,77 (0,70)	0,120
3 meses tras la carga	2,31 (0,68)	2,79 (0,82)	0,237
6 meses tras la carga	2,62 (0,46)	2,79 (0,68)	0,376
12 meses tras la carga	2,75 (0,58)	2,79 (0,68)	0,974
<b>Nivel óseo marginal del implante (MESIAL)</b>			
Colocación de implante	0,54 (0,35)	0,53 (0,45)	0,602
Carga protésica	0,13 (0,45)	0,01 (0,56)	0,678
3 meses tras la carga	0,10 (0,17)	-0,16 (0,63)	0,618
6 meses tras la carga	-0,08 (0,39)	0,01 (0,23)	0,592
12 meses tras la carga	-0,21 (0,49)	-0,02 (0,29)	0,175
<b>Nivel óseo marginal del implante (DISTAL)</b>			
Colocación de implante	0,39 (0,33)	0,32 (0,26)	0,706
Carga protésica	0,10 (0,25)	-0,10 (0,44)	0,659
3 meses tras la carga	0,05 (0,24)	-0,25 (0,45)	0,109
6 meses tras la carga	-0,20 (0,33)	-0,24 (0,45)	0,771
12 meses tras la carga	-0,23 (0,29)	-0,28 (0,43)	0,773
<b>Nivel óseo marginal por mesial del diente posterior</b>			
Colocación de implante	1,98 (1,08)	2,01 (0,85)	0,860

	<b>Grupo Control</b> (Impresiones dentales 8 semanas después de la colocación del implante)	<b>Grupo Test</b> (Impresiones dentales 4 semanas después de la colocación del implante)	<b>Valor p</b> *
Carga protésica	2,07 (1,27)	2,06 (0,85)	0,567
3 meses tras la carga	1,91 (0,95)	1,95 (0,59)	0,473
6 meses tras la carga	1,92 (0,91)	2,08 (1,02)	0,687
12 meses tras la carga	1,92 (0,86)	2,10 (0,93)	0,478
<b>Nivel óseo marginal del implante (promedio de mesial y distal)</b>			
Colocación de implante	0,46 (0,31)	0,42 (0,30)	0,571
Carga protésica	0,12 (0,31)	-0,04 (0,42)	0,507
3 meses tras la carga	0,07 (0,17)	-0,20 (0,49)	0,129
6 meses tras la carga	-0,14 (0,33)	-0,11 (0,30)	0,645
12 meses tras la carga	-0,22 (0,37)	-0,15 (0,32)	0,443
<b>Cambios en el nivel de hueso marginal desde el momento de colocación a la carga</b>			
Mesial	-0,38 (0,55)	-0,55 (0,70)	0,841
Distal	-0,25 (0,25)	-0,43 (0,40)	0,349
Promedio	-0,31 (0,38)	-0,48 (0,51)	0,312
<b>Cambios en el nivel de hueso marginal desde la carga hasta los 12 meses</b>			
Mesial	-0,34 (0,25)	-0,24 (0,33)	0,196
Distal	-0,33 (0,29)	-0,23 (0,18)	0,902
Promedio	-0,33 (0,21)	-0,23 (0,23)	0,261

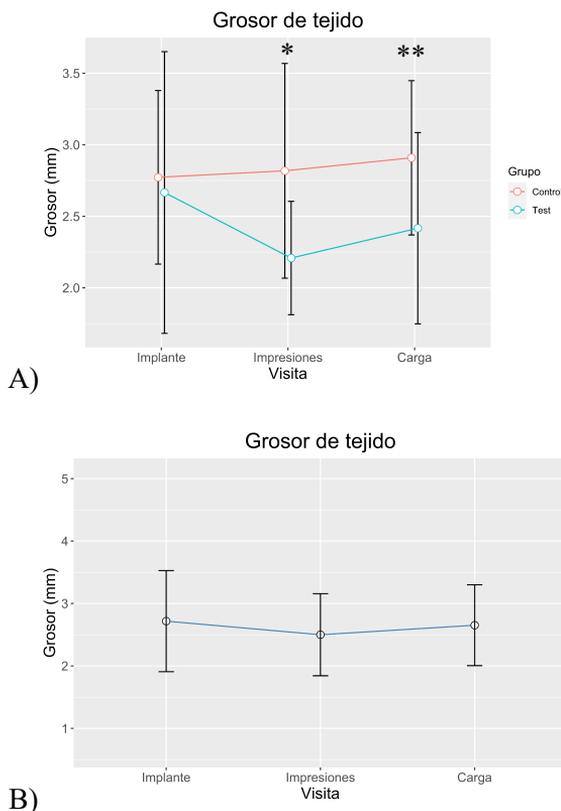
\*: Valor p: prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon.

## 6.C. Resultados a 5 años

Para el análisis de los datos a 5 años, sólo se incluyeron aquellos pacientes que completaron este seguimiento. Por tanto, las figuras y tablas a continuación incluyen solo esos pacientes en el resto de datos y variables desde el inicio. Además, debido al hecho de que, a 5 años, la posible influencia del tipo de carga en los resultados finales era previsiblemente muy reducida y a que la publicación inicial se realizó sólo con los resultados del seguimiento a 1 año, se presentarán a continuación los resultados tanto por grupos como de forma combinada.

### 6.C.1. Resultados clínicos

Como se puede observar en la **Tabla 4**, y con intención de no ser redundante, podemos resumir los resultados clínicos a 5 años indicando que son prácticamente iguales a los resultados a 1 año, con las diferencias entre grupos en las mismas variables y tiempos, esto es, en el grosor de la mucosa periimplantaria en el momento de las impresiones y la carga protésica. Concretamente fue de 2,81 (0,75) mm en el grupo Control y de 2,20 (0,40) mm en el grupo Test en el momento de las impresiones ( $p=0,011$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon) y de 2,91 (0,54) mm en el grupo Control y 2,42 (0,67) mm en el grupo Test en el momento de la carga protésica ( $p=0,047$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon) (**Figura 17**). A pesar de ello, aunque en valores absolutos se utilizó un mayor número de pilares transmucosos Ti-Base de 1,50 mm en el grupo Test, las diferencias con el grupo Control no fueron significativas ( $p=0,134$ , test de chi cuadrado). Respecto a los resultados del total de pacientes, no separados por grupos, ninguno de estos parámetros fue diferente a lo largo del tiempo.



**Figura 17:** Representación gráfica del grosor de tejido en las distintas visitas en que se evaluó, tanto de forma A) separada por grupos (con diferencias significativas entre grupos en las mediciones realizadas en el momento de la toma de impresiones (\*:  $p=0,011$ ) y en el momento de la carga protésica (\*\*:  $p=0,047$ )) como B) combinada para el total de pacientes analizados.

El resto de variables a lo largo del tiempo, así como los índices de papila, tanto mesial como distal, no mostraron diferencias significativas en ninguno de los momentos en que fueron registradas. Sí se detectó una mejora en el índice de papila con el tiempo, llegando a ser, a 12 meses, ideal en la mayoría de los casos, pero que decayó nuevamente en la visita de 60 meses (**Figura 18** y **Figura 19**).

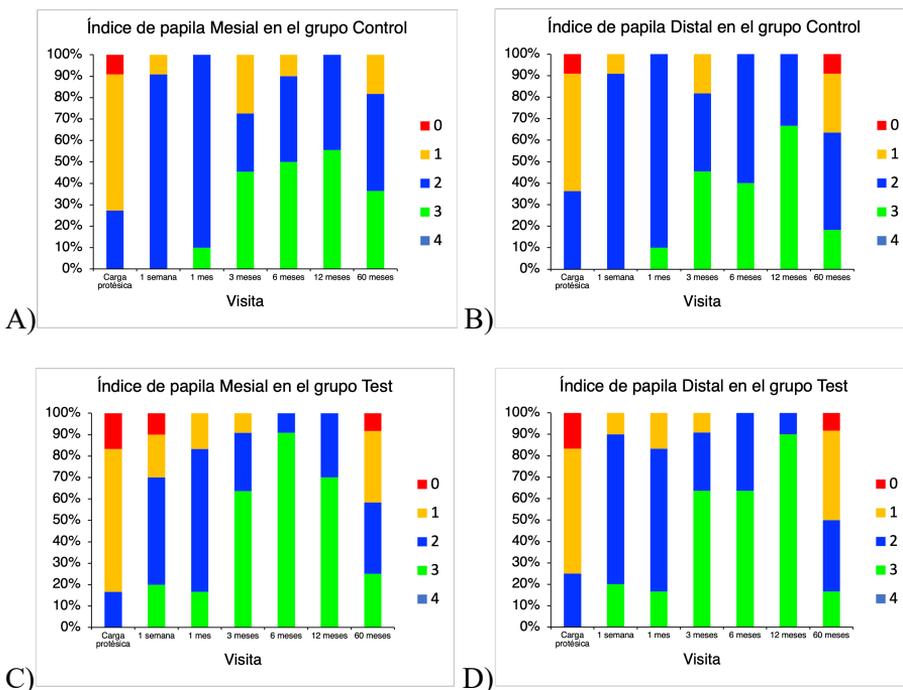


Figura 18: Índice de papila mesial y distal para cada grupo y momento temporal.

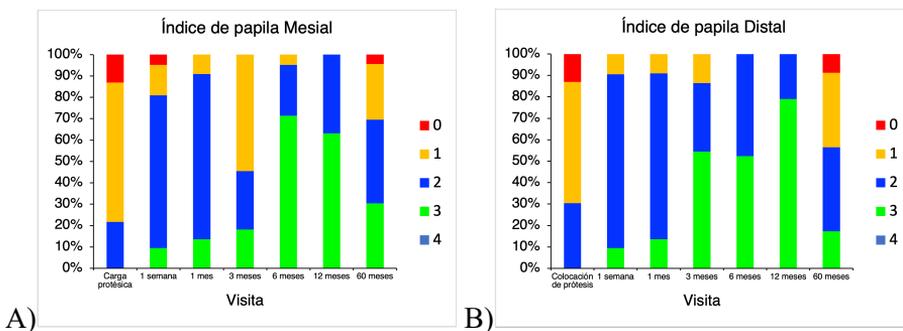


Figura 19: Índice de papila mesial y distal del conjunto de pacientes en cada momento temporal.

Cabe mencionar que uno de los pacientes analizados en la visita de 60 meses había perdido el diente adyacente distal al implante.

Todos los datos de las variables clínicas se presentan de forma detallada en la **Tabla 4**.



**Tabla 4:** Descripción y comparación de las variables clínicas de los pacientes incluidos en el estudio que fueron seguidos hasta la visita de evaluación de 5 años post-carga protésica.

	<b>Todos los pacientes n=23 (100%)</b>	<b>Grupo Control (Impresiones dentales 8 semanas después de la colocación del implante) n=11 (47,83%)</b>	<b>Grupo Test (Impresiones dentales 4 semanas después de la colocación del implante) n=12 (52,17%)</b>	<b>Valor p *</b>
<b>Edad</b> [media (min, max)] (años)	44 (30-58)	42 (30 - 58)	45 (35 - 53)	0,441
<b>Género</b> [n (%)]				
Mujer	10 (43,48)	6 (54,5)	4 (33,3)	0,305
Hombre	13 (56,52)	5 (45,5)	8 (66,7)	
<b>Consumo de tabaco</b> [n (%)]				
No	18 (78,26)	8 (72,7)	10 (83,3)	0,554
Bajo (<5 cigarrillos/día)	4 (17,39)	2 (18,2)	2 (16,7)	
Bajo (>5, <10 cigarrillos/día)	1 (4,35)	1 (9,1)	0 (0,0)	
<b>Distancia mesio-distal</b> [media (DE)] (mm)	8,93 (2,02)	8,68 (1,23)	9,17 (2,59)	0,708
<b>Altura oclusal</b> [media (DE)] (mm)	6,95 (1,60)	7,09 (2,03)	6,81 (1,08)	0,689
<b>Anchura buco-lingual</b> [media (DE)] (mm)				
Antes de abrir colgajo	7,26 (1,68)	7,73 (2,00)	6,83 (1,27)	0,199
Después de abrir colgajo	6,83 (1,61)	7,27 (1,55)	6,42 (1,62)	0,200
<b>Diámetro del implante</b> [n (%)]				
3,75 mm	15 (65,22)	8 (72,7)	7 (58,3)	0,469
4,20 mm	8 (34,78)	3 (27,3)	5 (41,7)	
<b>Longitud del implante</b> [n (%)]				
10,0 mm	11 (47,83)	6 (54,5)	5 (41,7)	0,537
11,5 mm	12 (52,17)	5 (45,5)	7 (58,3)	
<b>Días transcurridos desde la colocación del implante hasta la toma de impresiones</b> [media (DE)]	NA	59,45 (4,63)	30,08 (3,50)	<0,001 *
<b>Días transcurridos desde la colocación del implante hasta la carga protésica</b> [media (DE)]	NA	74,00 (9,12)	45,25 (3,49)	<0,001 *
<b>Altura del pilar</b> [n (%)]				
1,50 mm	16 (69,57)	6 (54,5)	10 (83,3)	0,134
3,00 mm	7 (30,43)	5 (45,5)	2 (16,7)	

	<b>Todos los pacientes n=23 (100%)</b>				<b>Grupo Control (Impresiones dentales 8 semanas después de la colocación del implante) n=11 (47,83%)</b>				<b>Grupo Test (Impresiones dentales 4 semanas después de la colocación del implante) n=12 (52,17%)</b>				<b>Valor p *</b>	
<b>Grosor de mucosa periimplantaria</b> [media (DE)] (mm)														
Colocación de implante	2,72 (0,81)				2,77 (0,61)				2,67 (0,98)				0,661	
Impresiones	2,50 (0,66)				2,81 (0,75)				2,20 (0,40)				0,011 *	
Carga protésica	2,65 (0,65)				2,91 (0,54)				2,42 (0,67)				0,047 *	
<b>Índice de papila [% por cada visita]</b> (MESIAL) **	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3		
Carga protésica	13,0	65,2	21,7	0,0	9,1	63,6	27,3	0,0	16,7	66,6	16,7	0,0	0,757	
1 semana tras la carga	4,86	14,3	71,4	9,5	0,0	9,1	90,9	0,0	10,0	20,0	50,0	20,0	0,175	
1 mes tras la carga	0,0	9,1	77,3	13,6	0,0	0,0	90,0	10,0	0,0	16,7	66,6	16,7	0,328	
3 meses tras la carga	0,0	54,6	27,3	18,2	0,0	27,3	27,3	45,4	0,0	9,1	27,3	63,6	0,513	
6 meses tras la carga	0,0	4,8	23,8	71,4	0,0	10,0	40,0	50,0	0,0	0,0	9,1	90,9	0,109	
12 meses tras la carga	0,0	0,0	36,8	63,2	0,0	0,0	44,4	55,6	0,0	0,0	30,0	70,0	0,515	
60 meses tras la carga	4,4	26,1	39,1	30,4	0,0	18,2	45,4	36,4	8,3	33,3	33,3	25,1	0,598	
<b>Índice de Papila [% por cada visita]</b> (DISTAL) **	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3		
Carga protésica	13,0	56,5	30,4	0,0	9,1	54,5	36,4	0,0	16,7	58,3	25,0	0,0	0,775	
1 semana tras la carga	0,0	9,5	81,0	9,5	0,0	9,1	90,9	0,0	0,0	10,0	70,0	20,0	0,288	
1 mes tras la carga	0,0	9,1	77,3	13,6	0,0	0,0	90,0	10,0	0,0	16,7	66,6	16,7	0,328	
3 meses tras la carga	0,0	13,6	31,8	54,5	0,0	18,2	36,4	45,4	0,0	9,1	27,3	63,6	0,667	
6 meses tras la carga	0,0	0,0	47,6	52,4	0,0	0,0	60,0	40,0	0,0	0,0	36,4	63,6	0,279	
12 meses tras la carga	0,0	0,0	21,1	79,0	0,0	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0	10,0	90,0	0,213	
60 meses tras la carga	8,7	34,8	39,1	17,4	9,1	27,3	45,4	18,2	8,3	41,7	33,3	16,7	0,904	

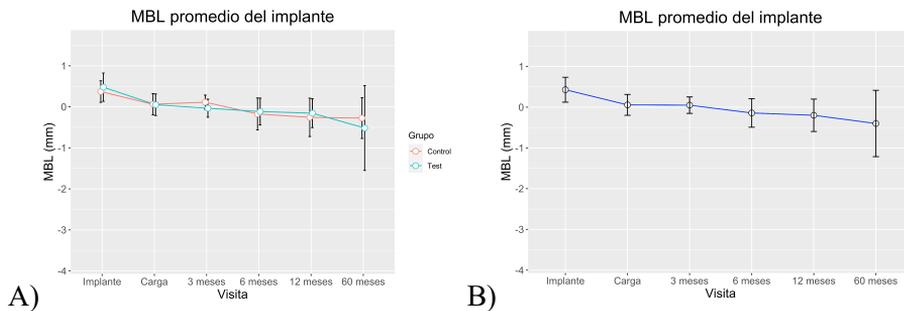
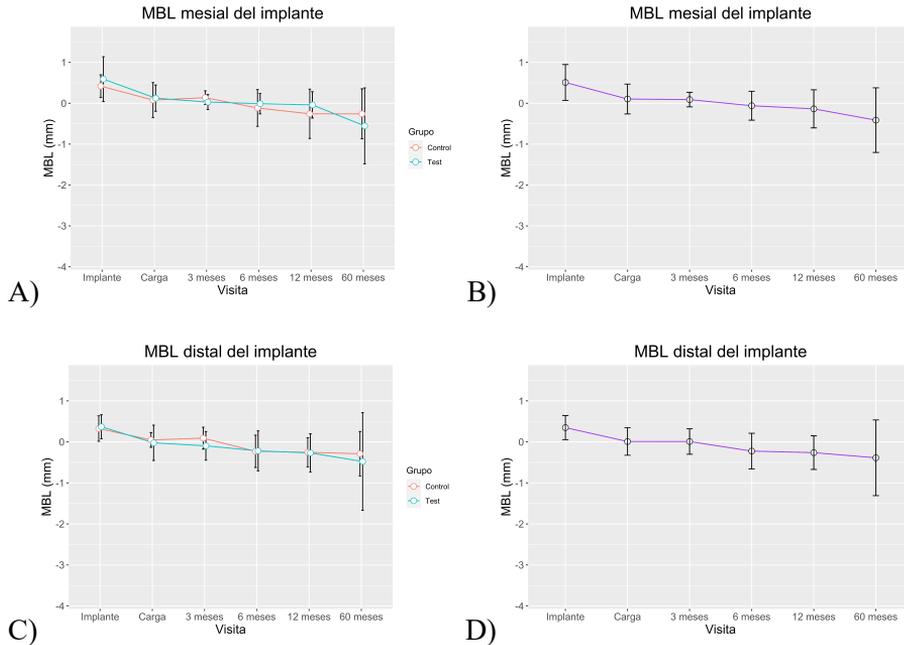
\* Valor p (Control vs. Test): prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon en variables continuas y prueba de chi cuadrado en variables categóricas.

\*\* : No hubo casos con índice de papila superior a 3.

### 6.C.2. Resultados radiográficos

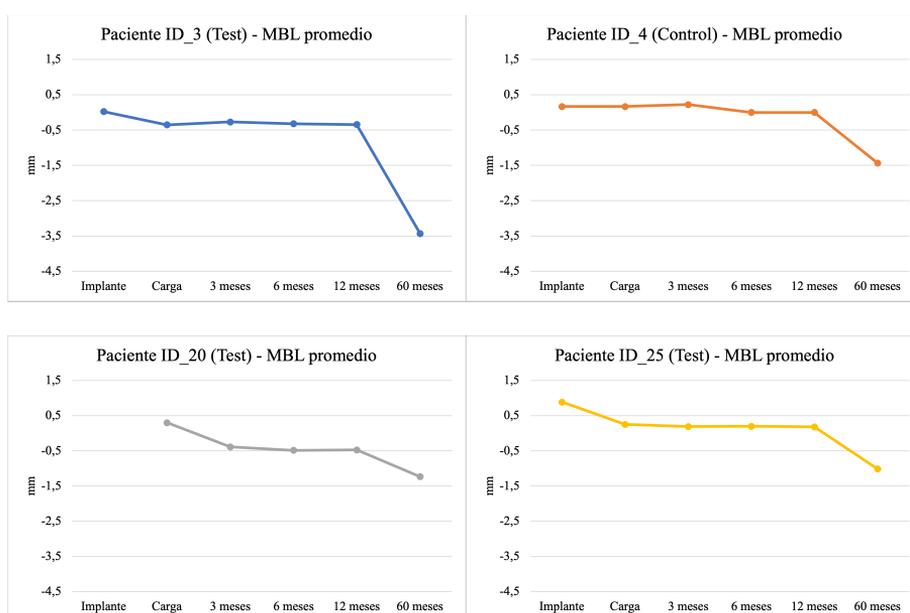
En cuanto a las mediciones radiográficas, para el conjunto de pacientes que completaron el seguimiento hasta los 60 meses de evaluación, pudieron observarse algunas diferencias significativas similares a las ya mencionadas para el conjunto de pacientes evaluados hasta 12 meses. Así, nuevamente, la longitud de la corona fue mayor en el grupo Test (8,38 (1,15) mm vs. 9,39 (0,83) mm para los grupos Control y Test, respectivamente;  $p=0,044$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon) aunque no las proporciones corona-implante (1,00 (0,17) vs. 1,03 (0,08) para los grupos Control y Test, respectivamente;  $p=0,566$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon).

Además, a diferencia de lo observado hasta los 12 meses de seguimiento, respecto al resto de variables, aunque ninguna fue diferente entre grupos en ninguno de los tiempos evaluados, sí hubo diferencias al comparar los tiempos entre sí. Particularmente en este caso, considerando los datos totales, sin separación por grupos, además de las diferencias observadas al comparar los distintos tiempos con el momento de la colocación del implante, lo que demuestra la remodelación inicial post-quirúrgica, también se observaron algunas diferencias adicionales entre los datos a 60 meses y los del momento de la carga y la evaluación a 3 meses, tanto en mesial ( $p=0,007$  y  $p=0,023$ ; 60 meses - Carga y 60 meses - 3 meses, respectivamente; modelo lineal general con contrastes de Tukey) como el valor promedio mesial-distal ( $p=0,012$  y  $p=0,033$ ; 60 meses - Carga y 60 meses - 3 meses, respectivamente; modelo lineal general con contrastes de Tukey) (**Figura 20** y **Figura 21**).



En el seguimiento a 5 años, un total de 4 pacientes (n° 3, 4, 20 y 25), 3 del grupo Test (n° 3, 20 y 25) y 1 del grupo Control (n° 4), mostraron niveles radiográficos de pérdida de hueso alrededor del implante superiores a 1 mm y, concretamente uno de ellos, superiores a 3 mm (**Figura 22**). Estos niveles de pérdida de hueso marginal pueden ser considerados, según los criterios del Workshop para Enfermedades periimplantarias (Berglundh et al. 2018), como

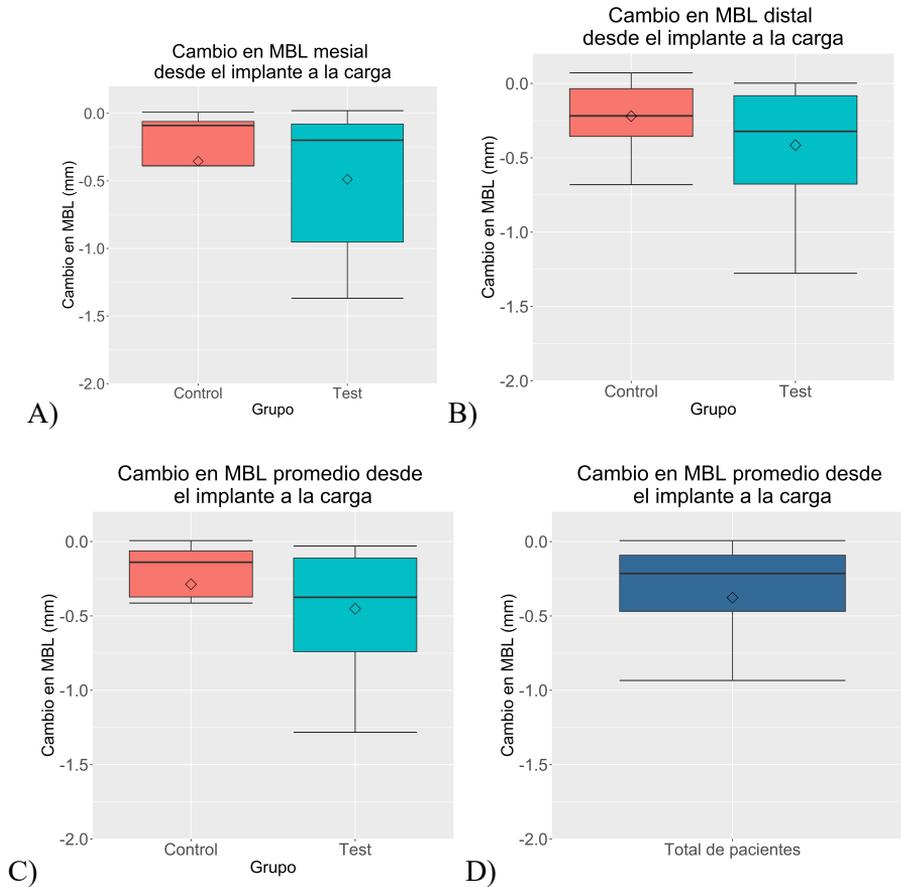
periimplantitis. Sin embargo, en tres de ellos sí se cumplen los criterios de éxito del Consenso de Pisa (Misch et al. 2008), al no exceder los 2 mm de pérdida marginal ósea. También cabe remarcar que el paciente que experimentó la pérdida marginal ósea superior a 2 mm, concretamente llegando a -3,436 mm, sufrió la extracción del diente contiguo posterior entre el seguimiento a 12 meses y el seguimiento a 60, lo que puede explicar, en parte, esta situación, como consecuencia de la patología del diente adyacente y de la remodelación ósea post-extracción.



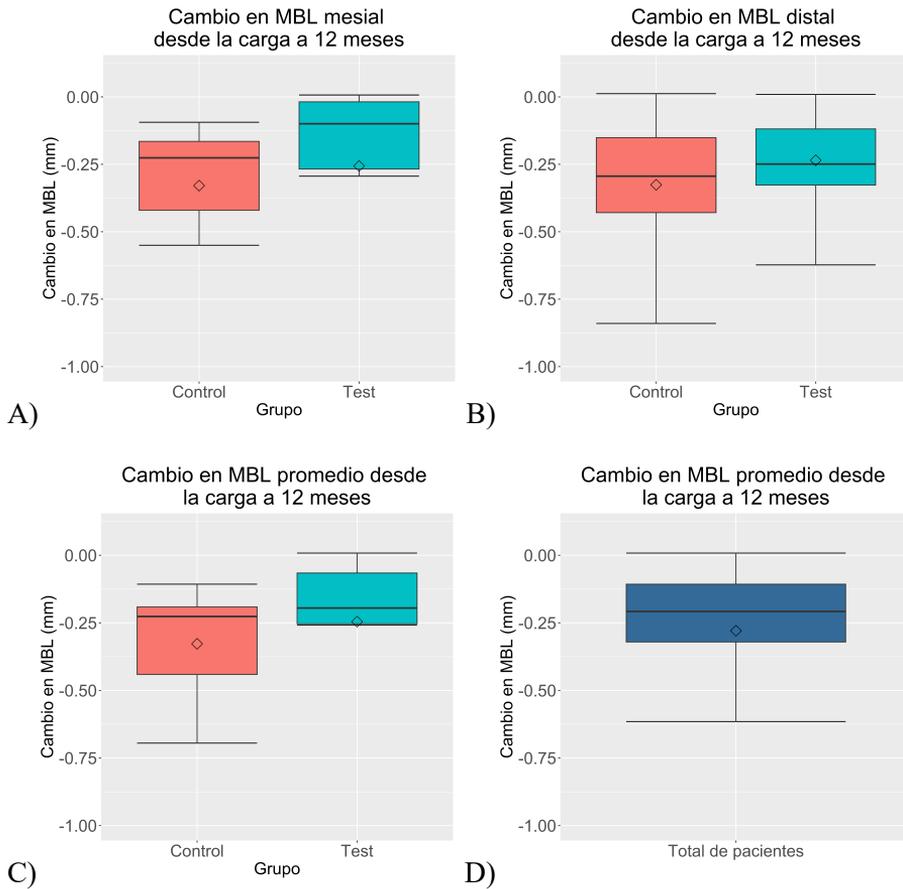
**Figura 22:** Representación gráfica del nivel de hueso marginal a cada tiempo desde el implante hasta el seguimiento a 60 meses en los pacientes que alcanzaron niveles superiores a 1 mm apical al hombro del implante.

Específicamente, si analizamos individualmente la magnitud del cambio promedio mesial-distal desde la colocación del implante hasta la carga, ésta fue de -0,29 (0,39) mm en el grupo Control frente a -0,45 (0,42) mm en el grupo Test ( $p=0,230$ , prueba de suma de rangos de Wilcoxon). Si consideramos los valores de todos los pacientes en conjunto, el cambio promedio fue de -0,38 (0,41) mm (**Figura 23**). Considerando el cambio de

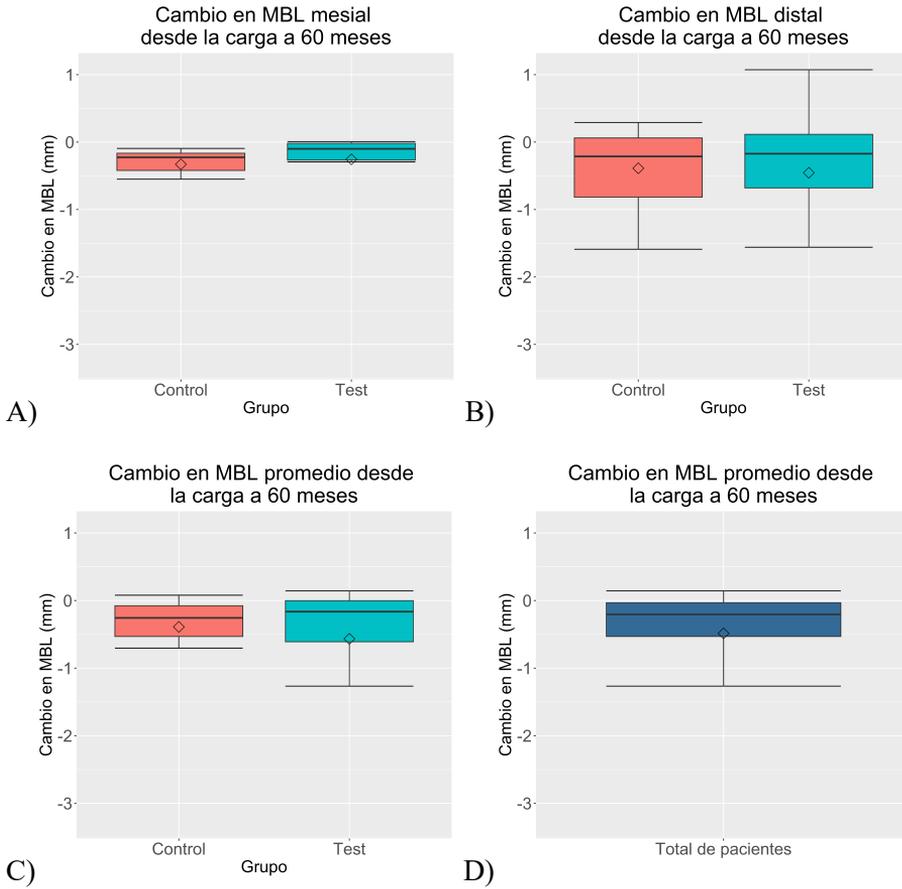
todos los pacientes sin distinción de grupo desde el momento de la carga protésica hasta el seguimiento a 12 meses, este fue de  $-0,28$  ( $0,24$ ) mm (**Figura 23**), de  $-0,49$  ( $0,77$ ) mm desde la carga protésica hasta los 60 meses (**Figura 25**), y de  $-0,17$  ( $0,87$ ) mm desde los 12 a los 60 meses (**Figura 26**).



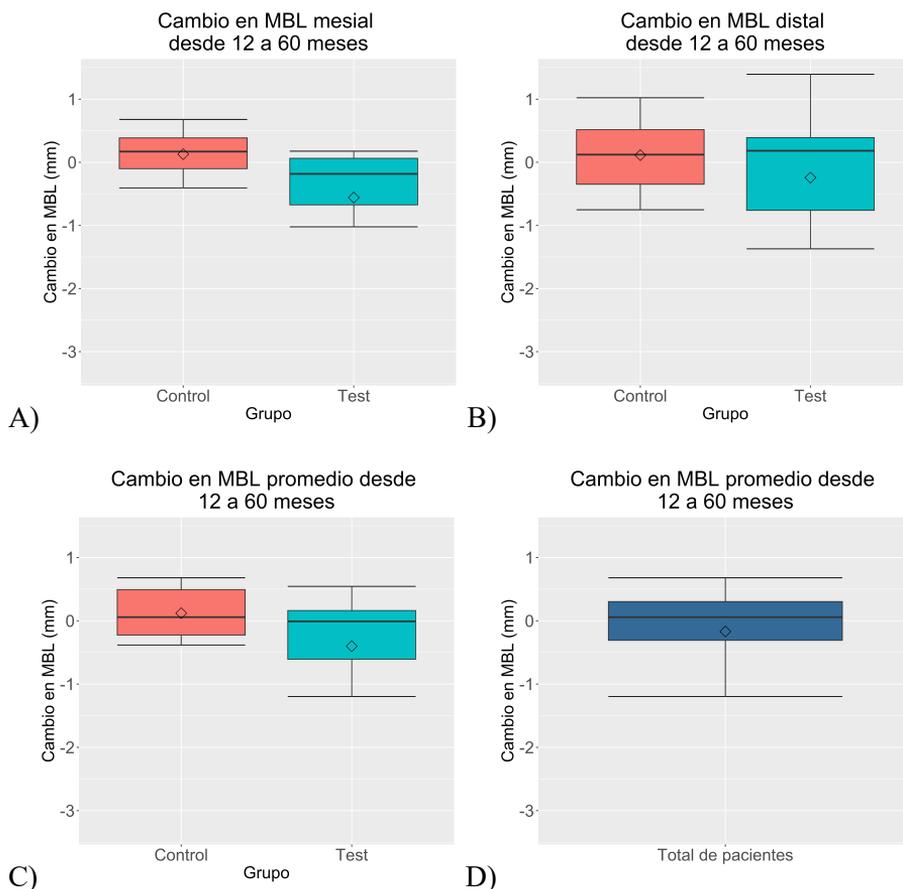
**Figura 23:** Diagramas de caja representando el cambio de MBL desde la colocación del implante hasta el momento de la carga protésica en A) mesial, B) distal, C) promedio, así como D) el valor promedio sin distinción de grupos. El rombo indica la media.



**Figura 24:** Diagramas de caja representando el cambio de MBL desde la carga protésica hasta el seguimiento a 12 meses en A) mesial, B) distal, C) promedio, así como D) el valor promedio sin distinción de grupos. El rombo indica la media.



**Figura 25:** Diagramas de caja representando el cambio de MBL desde la carga protésica hasta el seguimiento a 60 meses en A) mesial, B) distal, C) promedio, así como D) el valor promedio sin distinción de grupos. El rombo indica la media.



**Figura 26:** Diagramas de caja representando el cambio de MBL desde el seguimiento a 12 meses hasta el de 60 meses en A) mesial, B) distal, C) promedio, así como D) el valor promedio sin distinción de grupos. El rombo indica la media.

Por último, al igual que a los 12 meses, también se analizaron datos relativos a los dientes adyacentes, tanto la distancia entre el implante y el diente anterior y posterior como los niveles óseos en distal del diente anterior y mesial del diente posterior y ninguno de estos valores fue diferente entre grupos ni cambió significativamente a lo largo del tiempo.

Todas las mediciones radiográficas se encuentran detalladas en la **Tabla 5**.



**Tabla 5:** Descripción y comparación de variables radiográficas (media (DE)) en mm, excepto la relación corona-implante, de pacientes seguidos hasta 5 años.

	<b>Todos los pacientes</b>	<b>Grupo Control</b> (Impresiones dentales 8 semanas después de la colocación del implante)	<b>Grupo Test</b> (Impresiones dentales 4 semanas después de la colocación del implante)	<b>Valor p *</b>
<b>Distancia implante - diente anterior</b>	2,45 (1,28)	2,07 (1,17)	2,79 (1,34)	0,314
<b>Distancia implante - diente posterior</b>	2,31 (1,18)	2,19 (1,13)	2,41 (1,28)	0,863
<b>Longitud de la corona</b>	8,91 (1,10)	8,38 (1,15)	9,39 (0,83)	0,044 *
<b>Ratio corona - implante</b>	1,01 (0,13)	1,00 (0,17)	1,03 (0,08)	0,566
<b>Nivel óseo marginal por distal del diente anterior</b>				
Colocación de implante	2,49 (0,71)	2,25 (0,76)	2,69 (0,61)	0,152
Carga protésica	2,65 (0,67)	2,42 (0,60)	2,86 (0,68)	0,132
3 meses tras la carga	2,61 (0,78)	2,35 (0,77)	2,92 (0,75)	0,295
6 meses tras la carga	2,83 (0,54)	2,69 (0,43)	2,93 (0,61)	0,310
12 meses tras la carga	2,92 (0,53)	2,86 (0,53)	2,97 (0,57)	0,798
60 meses tras la carga	3,02 (1,05)	2,97 (0,92)	3,08 (1,19)	0,880
<b>Nivel óseo marginal del implante (MESIAL)</b>				
Colocación de implante	0,51 (0,44)	0,42 (0,28)	0,59 (0,55)	0,705
Carga protésica	0,10 (0,37)	0,08 (0,43)	0,12 (0,32)	0,921
3 meses tras la carga	0,09 (0,18)	0,14 (0,17)	0,03 (0,18)	0,426
6 meses tras la carga	-0,06 (0,35)	-0,12 (0,45)	-0,01 (0,25)	0,944
12 meses tras la carga	-0,14 (0,47)	-0,26 (0,60)	-0,04 (0,32)	0,594
60 meses tras la carga	-0,31 (0,79)	-0,26 (0,61)	-0,55 (0,93)	0,518
<b>Nivel óseo marginal del implante (DISTAL)</b>				
Colocación de implante	0,35 (0,29)	0,32 (0,31)	0,37 (0,29)	0,503

	<b>Todos los pacientes</b>	<b>Grupo Control</b> (Impresiones dentales 8 semanas después de la colocación del implante)	<b>Grupo Test</b> (Impresiones dentales 4 semanas después de la colocación del implante)	<b>Valor p *</b>
Carga protésica	0,01 (0,34)	0,05 (0,18)	-0,02 (0,43)	0,553
3 meses tras la carga	0,01 (0,31)	0,09 (0,27)	-0,10 (0,35)	0,142
6 meses tras la carga	-0,22 (0,43)	-0,23 (0,39)	-0,22 (0,49)	0,778
12 meses tras la carga	-0,26 (0,41)	-0,25 (0,36)	-0,27 (0,47)	0,722
60 meses tras la carga	-0,39 (0,92)	-0,29 (0,54)	-0,48 (1,19)	0,644
<b>Nivel óseo marginal por mesial del diente posterior</b>				
Colocación de implante	1,91 (0,87)	1,98 (1,23)	1,85 (0,45)	0,766
Carga protésica	1,87 (0,82)	1,87 (1,16)	1,86 (0,50)	0,464
3 meses tras la carga	2,02 (0,92)	2,01 (1,10)	2,05 (0,66)	0,607
6 meses tras la carga	1,96 (0,82)	2,08 (1,04)	1,86 (0,63)	0,766
12 meses tras la carga	1,97 (0,74)	2,10 (0,97)	1,87 (0,54)	0,965
60 meses tras la carga	2,64 (0,90)	2,79 (1,03)	2,48 (0,76)	0,622
<b>Nivel óseo marginal del implante (promedio de mesial y distal)</b>				
Colocación de implante	0,43 (0,31)	0,37 (0,26)	0,48 (0,35)	0,512
Carga protésica	0,06 (0,26)	0,06 (0,26)	0,05 (0,26)	0,872
3 meses tras la carga	0,05 (0,20)	0,11 (0,17)	-0,03 (0,22)	0,142
6 meses tras la carga	-0,14 (0,35)	-0,17 (0,39)	-0,12 (0,33)	0,549
12 meses tras la carga	-0,20 (0,40)	-0,26 (0,47)	-0,15 (0,35)	0,573
60 meses tras la carga	-0,40 (0,81)	-0,27 (0,50)	-0,52 (1,03)	0,976
<b>Cambios en el nivel de hueso marginal desde el momento de la colocación a la carga</b>				
Mesial	-0,43 (0,54)	-0,35 (0,57)	-0,49 (0,54)	0,656
Distal	-0,33 (0,35)	-0,22 (0,24)	-0,42 (0,41)	0,342
Promedio	-0,38 (0,41)	-0,29 (0,39)	-0,45 (0,42)	0,230

	<b>Todos los pacientes</b>	<b>Grupo Control</b> (Impresiones dentales 8 semanas después de la colocación del implante)	<b>Grupo Test</b> (Impresiones dentales 4 semanas después de la colocación del implante)	<b>Valor p *</b>
<b>Cambios en el nivel de hueso marginal desde el momento de la carga protésica hasta 12 meses</b>				
Mesial	-0,29 (0,32)	-0,33 (0,26)	-0,26 (0,36)	0,270
Distal	-0,27 (0,23)	-0,33 (0,29)	-0,24 (0,19)	0,962
Promedio	-0,28 (0,24)	-0,33 (0,22)	-0,25 (0,25)	0,364
<b>Cambios en el nivel de hueso marginal desde el momento de la carga protésica hasta 60 meses</b>				
Mesial	-0,55 (0,81)	-0,39 (0,47)	-0,68 (1,01)	0,872
Distal	-0,42 (0,86)	-0,39 (0,60)	-0,45 (1,05)	0,923
Promedio	-0,49 (0,77)	-0,39 (0,49)	-0,57 (0,95)	0,722
<b>Cambios en el nivel de hueso marginal desde los 12 hasta los 60 meses</b>				
Mesial	-0,09 (0,97)	0,11 (0,58)	-0,24 (1,21)	0,762
Distal	-0,25 (0,87)	0,13 (0,39)	-0,56 (1,04)	0,068
Promedio	-0,17 (0,87)	0,12 (0,42)	-0,40 (1,08)	0,515

\*Valor p: prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon.



## 6.D. Resultados microbiológicos

El análisis microbiológico detectó la presencia de un total de 38 filos, 1290 géneros y 4740 especies. Sin embargo, sólo 19 filos tienen una abundancia relativa mayor a 0,01% representando el 99,97% del total de filos. Respecto a los géneros, sólo 29 de ellos, que representan el 93,19% del total, tienen una abundancia relativa superior al 0,5%. Finalmente, respecto a las especies, 41 de ellas con abundancia relativa superior al 1% representan el 73,13% del total. Esto determinó que, a nivel de especie, considerando conjuntamente aquellas con una abundancia inferior al 1%, los índices de diversidad de Shannon e inverso de Simpson estuviesen dentro de los rangos de 2 y 6, respectivamente, en cada una de las visitas (**Tabla 6**, **Tabla 7** y **Figura 27**).

**Tabla 6:** Índice de Shannon en cada uno de los grupos o considerando los pacientes en su conjunto a cada uno de los tiempos de análisis.

	Todos	Control	Test	Valor p *
<b>1 mes</b>	2,384 (0,355)	2,508 (0,298)	2,284 (0,379)	0,101
<b>3 meses</b>	2,313 (0,367)	2,348 (0,387)	2,274 (0,361)	0,497
<b>12 meses</b>	2,222 (0,305)	2,359 (0,229)	2,066 (0,321)	0,054
<b>60 meses</b>	2,005 (0,656)	1,776 (0,833)	2,235 (0,313)	0,190
<b>Valor p **</b>	0,073	0,032 **	0,454	

\*: Prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon (Control vs. Test).

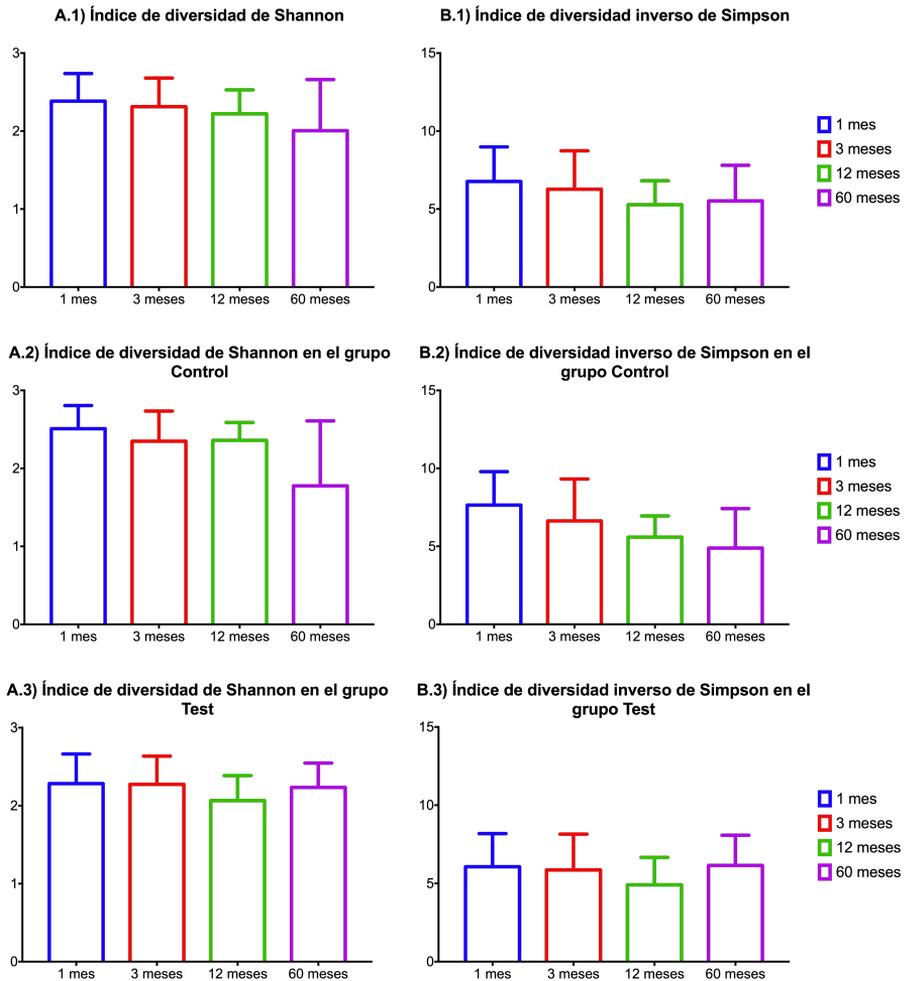
\*\* : Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Comparaciones por pares mediante corrección de Bonferroni: diferencia significativa entre 1 y 60 meses ( $p=0,021$ ).

**Tabla 7:** Índice inverso de Simpson en cada uno de los grupos o considerando los pacientes en su conjunto a cada uno de los tiempos de análisis.

	Todos	Control	Test	Valor p *
<b>1 mes</b>	6,770 (2,215)	7,647 (2,139)	6,068 (2,115)	0,173
<b>3 meses</b>	6,268 (2,468)	6,631 (2,685)	5,864 (2,290)	0,400
<b>12 meses</b>	5,274 (1,535)	5,589 (1,360)	4,913 (1,747)	0,281
<b>60 meses</b>	5,519 (2,286)	4,889 (2,532)	6,148 (1,933)	0,218
<b>Valor p **</b>	0,181	0,092	0,644	

\*: Prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon.

\*\* : Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.



**Figura 27:** Representación en gráfico de barras de los índices de diversidad A) de Shannon y B) inverso de Simpson a los distintos tiempos en 1) el conjunto de pacientes, 2) en el grupo Control y 3) en el grupo Test.

La observación detenida de estos datos, a nivel de filo (Tabla 8 y Figura 28), muestra que son los filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria y Spirochaetes los que tienen el peso de la población microbiológica global, perteneciendo a ellos casi el 95% de todas las bacterias detectadas en cualquiera de los tiempos analizados. Aunque se pueden observar variaciones en su abundancia relativa a lo largo del tiempo, sin embargo, la única que muestra diferencias significativas ( $p=0,003$ , prueba

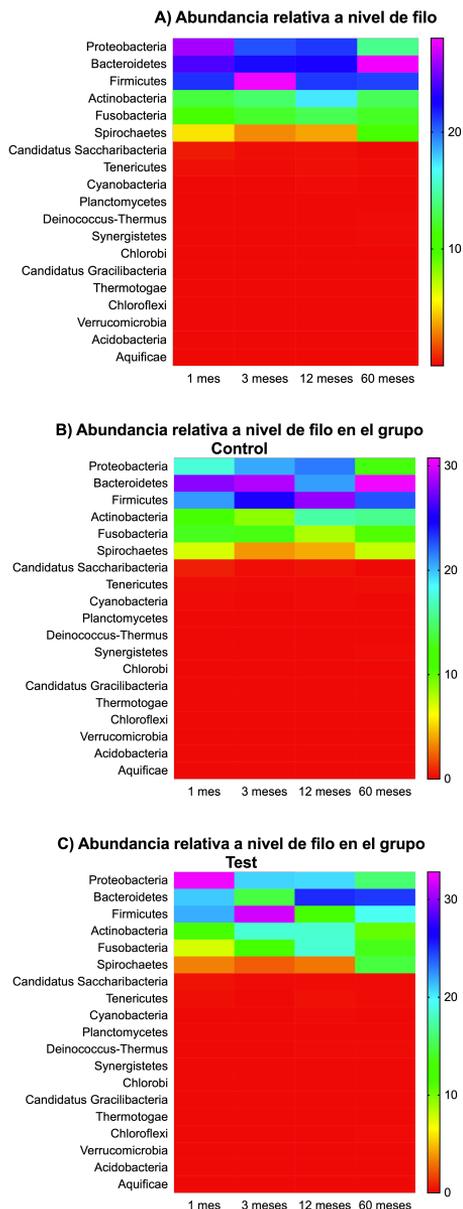
no paramétrica de Kruskal Wallis), disminuyendo considerablemente, es el filo *Candidatus Saccharibacteria*, concretamente entre 1 y 60 meses (0,51 (0,72) % vs. 0,05 (0,14) %;  $p < 0,001$ , corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples) y entre 3 y 60 meses (0,19 (0,23) % vs. 0,05 (0,14) %;  $p = 0,006$ , corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples). Cabe mencionar que no hubo diferencias entre grupos en ninguno de los tiempos analizados.

A nivel de géneros (**Tabla 9** y **Figura 29**), la mayor abundancia se encuentra en *Prevotella*, *Haemophilus* y *Streptococcus*, seguidos de *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Veillonella*, *Capnocytophaga*, *Rothia* y *Selenomonas*. Otros géneros, potencialmente relevantes, por analogía con el surco periodontal, incluyen a *Aggregatibacter*, *Tannerella*, y *Porphyromonas*, aunque con abundancias muy bajas, inferiores al 1% respecto al total. Estos géneros, aunque se mantienen a lo largo del tiempo sin diferencias significativas, sí varían, algunos de forma relevante, como *Porphyromonas*, que pasa de 0,66 (0,81) % en la visita de 1 mes a 8,34 (13,49) % en la visita de 60 meses, si bien el cambio se concentra en algunos individuos muy concretos y no en el conjunto de pacientes. Podemos encontrar también algunos cambios significativos a lo largo del tiempo, como son los que experimentan los géneros *Neisseria*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Selenomonas*, *Leptotrichia*, *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Schaalia*, *Chryseobacterium*, *Klebsiella*, *Cutibacterium* y *Staphylococcus*. El análisis post-hoc mediante correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples muestra, nuevamente, que la mayoría de los cambios se produce en la comparación entre los tiempos 1 y 60 meses y entre 3 y 60 meses. En la comparación entre grupos a nivel de género tampoco se observaron diferencias en ninguno de los tiempos analizados.

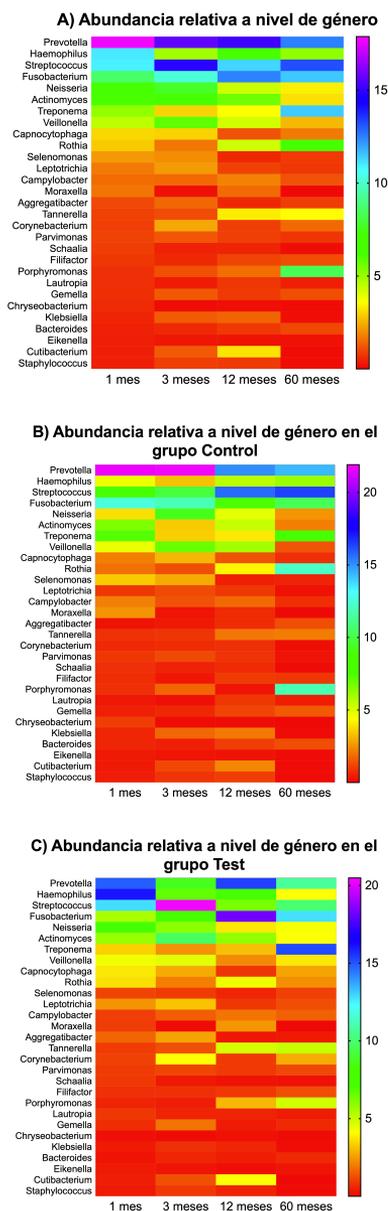
Finalmente, a nivel de especie (**Tabla 10** y **Figura 30**), detectamos también microorganismos reconocidos que permanecen estables a lo largo del tiempo, como *Haemophilus parainfluenzae*, una bacteria común del tracto respiratorio, y otras habituales del ambiente periodontal y periimplantario como

---

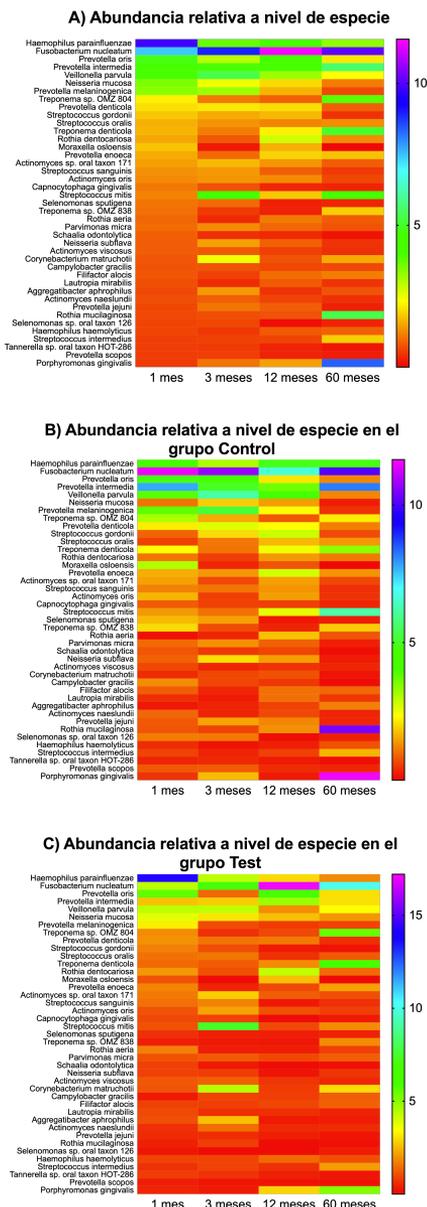
*Fusobacterium nucleatum* o *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* o *Rothia dentocariosa*. En otros casos, sí se detectaron diferencias significativas a lo largo del tiempo en la abundancia relativa de *Veillonella parvula*, *Neisseria mucosa*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus gordonii*, *Moraxella osloensis*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces oris*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Selenomonas sputigena*, *Schaalia odontolytica*, *Neisseria subflava*, *Corynebacterium matruchotii* y *Prevotella jejuni*. Al igual que se mencionó anteriormente, la especie *Porphyromonas gingivalis* sufre un cambio a lo largo del tiempo bastante relevante, pero principalmente en algunos pacientes muy concretos. El análisis post-hoc mediante correcciones de Bonferroni para comparaciones múltiples muestra, nuevamente, que la mayoría de los cambios se produce en la comparación entre los tiempos 1 y 60 meses y entre 3 y 60 meses. En este caso, hubo algunas diferencias entre grupos en la distribución a 1 mes de *Prevotella intermedia* y *Prevotella melaninogenica*, más abundantes en el grupo Control, y *Rothia aeria* y *Prevotella scopos*, más abundantes en el grupo Test. Sin embargo, a 3, 12 y 60 meses estas diferencias entre grupos no existen.



**Figura 28:** Representación en gráfico mapa de calor de la abundancia relativa en cada tiempo de evaluación a nivel de filo en A) el total de pacientes, B) grupo Control y C) grupo Test. Se han agrupado como “Otros” los filios que tuviesen menos de un 0,01% de abundancia relativa dentro de cada tiempo. Para la representación, se ordenaron los filios en base a la abundancia a 1 mes.



**Figura 29:** Representación en gráfico mapa de calor de la abundancia relativa en cada tiempo de evaluación a nivel de género en A) el total de pacientes, B) grupo Control y C) grupo Test. Se han agrupado como “Otros” los géneros que tuviesen menos de un 0,5% de abundancia relativa dentro de cada tiempo. Para la representación, se ordenaron los géneros en base a la abundancia a 1 mes.



**Figura 30:** Representación en gráfico mapa de calor de la abundancia relativa en cada tiempo de evaluación a nivel de especie en A) el total de pacientes, B) grupo Control y C) grupo Test. Se han agrupado como “Otras” las especies que tuviesen menos de un 1% de abundancia relativa dentro de cada tiempo. Para la representación, se ordenaron las especies en base a la abundancia a 1 mes.



**Tabla 8:** Distribución de abundancia relativa de los diferentes filos por cada tiempo evaluado ordenados según la abundancia a 1 mes. Se han agrupado como “Otros” los filos con una abundancia relativa inferior a 0,01%. Se indica media (DE) en %.

<b>FILO</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>12 meses</b>	<b>60 meses</b>	<b>Valor p *</b>
<b>Proteobacteria</b>		26,03 (20,43)	20,64 (15,29)	21,16 (16,05)	14,31 (12,79)	0,152
<b>Bacteroidetes</b>		24,09 (15,36)	22,21 (14,31)	22,84 (13,88)	27,78 (19,07)	0,880
<b>Firmicutes</b>		21,35 (8,83)	28,03 (17,89)	21,18 (9,59)	20,97 (15,81)	0,505
<b>Actinobacteria</b>		12,55 (9,81)	13,49 (16,28)	17,32 (15,86)	13,15 (22,95)	0,273
<b>Fusobacteria</b>		10,01 (8,76)	12,13 (7,48)	13,01 (10,89)	12,04 (13,33)	0,600
<b>Spirochaetes</b>		4,99 (8,96)	2,99 (3,77)	3,60 (4,84)	11,16 (15,91)	0,471
<b>Candidatus Saccharibacteria</b>		0,51 (0,72)	0,19 (0,23)	0,26 (0,53)	0,05 (0,14)	0,003 **
<b>Tenericutes</b>		0,24 (0,50)	0,10 (0,09)	0,25 (0,40)	0,15 (0,23)	0,575
<b>Cyanobacteria</b>		0,06 (0,05)	0,06 (0,06)	0,11 (0,11)	0,05 (0,05)	0,270
<b>Planctomycetes</b>		0,05 (0,08)	0,03 (0,03)	0,02 (0,04)	0,03 (0,05)	0,364
<b>Deinococcus-Thermus</b>		0,02 (0,03)	0,02 (0,06)	0,06 (0,15)	0,09 (0,36)	0,804
<b>Synergistetes</b>		0,01 (0,03)	0,02 (0,02)	0,04 (0,09)	0,08 (0,25)	0,963
<b>Chlorobi</b>		0,01 (0,03)	0,01 (0,02)	0,01 (0,02)	0,01 (0,01)	0,693
<b>Candidatus Gracilibacteria</b>		0,01 (0,03)	0,00 (0,02)	0,02 (0,05)	0,00 (0,00)	0,068

<b>FILO</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>12 meses</b>	<b>60 meses</b>	<b>Valor p *</b>
<b>Thermotogae</b>		0,01 (0,02)	0,01 (0,01)	0,02 (0,04)	0,01 (0,01)	0,949
<b>Chloroflexi</b>		0,01 (0,01)	0,02 (0,06)	0,01 (0,05)	0,07 (0,11)	0,377
<b>Verrucomicrobia</b>		0,01 (0,01)	0,03 (0,06)	0,00 (0,01)	0,01 (0,02)	0,364
<b>Acidobacteria</b>		0,00 (0,01)	0,01 (0,01)	0,01 (0,02)	0,00 (0,00)	0,819
<b>Aquificae</b>		0,00 (0,01)	0,00 (0,00)	0,01 (0,03)	0,01 (0,03)	0,779
<b>Otros</b>		0,03 (0,00)	0,02 (0,00)	0,06 (0,03)	0,04 (0,01)	-

\*: Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

\*\* : Comparaciones por pares de tiempos mediante corrección de Bonferroni: diferencia significativa entre 1 y 60 meses ( $p < 0,001$ ) y entre 3 y 60 meses ( $p = 0,006$ ).

**Tabla 9:** Distribución de abundancia relativa de los diferentes géneros por cada tiempo evaluado ordenados según la abundancia a 1 mes. Se han agrupado como “Otros” los géneros con una abundancia relativa inferior a 0,5%. Se indica media (DE) en %.

<b>GÉNERO</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>12 meses</b>	<b>60 meses</b>	<b>Valor p *</b>
<i>Prevotella</i>		17,88 (15,57)	15,64 (13,58)	15,19 (12,99)	12,50 (13,94)	0,717
<i>Haemophilus</i>		11,00 (16,79)	4,89 (6,11)	6,34 (8,70)	5,10 (9,10)	0,149
<i>Streptococcus</i>		10,92 (7,22)	14,87 (17,85)	11,30 (7,68)	13,20 (13,81)	0,916
<i>Fusobacterium</i>		8,61 (8,98)	10,17 (8,11)	12,48 (11,40)	11,50 (13,40)	0,668
<i>Neisseria</i>		6,32 (7,25)	7,67 (9,77)	4,30 (6,33)	3,37 (5,39)	0,049 **
<i>Actinomyces</i>		6,12 (7,03)	6,45 (12,33)	5,60 (7,99)	3,16 (5,43)	0,042 **
<i>Treponema</i>		5,11 (9,33)	2,97 (3,95)	3,55 (5,06)	11,49 (16,41)	0,436
<i>Veillonella</i>		4,49 (4,73)	5,82 (5,09)	4,21 (3,56)	2,58 (3,55)	0,033 **
<i>Capnocytophaga</i>		3,03 (4,02)	2,95 (4,01)	1,14 (1,27)	1,71 (3,39)	0,114
<i>Rothia</i>		2,85 (3,05)	1,65 (1,86)	4,27 (6,94)	7,21 (22,09)	0,819
<i>Selenomonas</i>		2,14 (3,82)	1,97 (2,92)	0,53 (0,53)	0,79 (1,89)	0,039 **
<i>Leptotrichia</i>		1,71 (2,84)	2,16 (3,61)	0,89 (0,90)	0,73 (1,74)	0,016 **
<i>Campylobacter</i>		1,52 (1,88)	1,46 (1,48)	1,82 (1,54)	1,15 (1,32)	0,493
<i>Moraxella</i>		1,64 (4,61)	0,18 (0,34)	1,49 (3,98)	0,01 (0,02)	<0,001 **
<i>Aggregatibacter</i>		1,02 (1,34)	1,43 (2,69)	0,53 (0,83)	0,83 (2,03)	0,406

<b>GÉNERO</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>1 mes</b>	<b>3 meses</b>	<b>12 meses</b>	<b>60 meses</b>	<b>Valor p *</b>
<i>Tannerella</i>		0,89 (1,19)	1,05 (1,12)	3,31 (3,59)	3,57 (4,65)	0,249
<i>Corynebacterium</i>		0,87 (1,04)	2,34 (3,97)	0,85 (0,93)	1,46 (4,10)	0,020 **
<i>Parvimonas</i>		0,92 (1,50)	1,19 (1,41)	0,87 (1,24)	0,71 (1,46)	0,092
<i>Schaalia</i>		0,84 (0,82)	0,45 (0,44)	0,48 (0,54)	0,15 (0,20)	0,001 **
<i>Filifactor</i>		0,74 (1,70)	0,53 (0,94)	0,94 (1,39)	1,06 (1,32)	0,682
<i>Porphyromonas</i>		0,66 (0,81)	1,11 (2,66)	1,53 (3,69)	8,34 (13,49)	0,136
<i>Lautropia</i>		0,64 (1,09)	0,35 (0,81)	0,73 (1,22)	0,42 (0,68)	0,687
<i>Gemella</i>		0,61 (0,60)	1,22 (1,77)	0,80 (0,63)	1,08 (1,67)	0,269
<i>Chryseobacterium</i>		0,57 (1,71)	0,11 (0,08)	0,17 (0,28)	0,06 (0,08)	0,023 **
<i>Klebsiella</i>		0,47 (0,64)	1,27 (2,78)	1,38 (2,31)	0,12 (0,17)	<0,001 **
<i>Bacteroides</i>		0,43 (0,59)	0,54 (0,68)	0,76 (1,25)	0,98 (1,88)	0,966
<i>Eikenella</i>		0,40 (0,53)	0,29 (0,34)	0,23 (0,32)	0,18 (0,34)	0,112
<i>Cutibacterium</i>		0,39 (0,51)	1,24 (2,17)	3,18 (5,09)	0,08 (0,17)	<0,001 **
<i>Staphylococcus</i>		0,41 (0,51)	0,87 (1,78)	0,80 (0,69)	0,12 (0,15)	<0,001 **
<b>Otros</b>		6,81 (0,07)	7,18 (0,07)	10,31 (0,09)	6,35 (0,12)	-

\*: Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

\*\* : Comparaciones por pares de tiempos mediante corrección de Bonferroni significativas:

- *Veillonella*: diferencia significativa entre 3 y 60 meses ( $p=0,031$ ).
- *Selenomonas*: diferencia significativa entre 3 y 60 meses ( $p=0,037$ ).
- *Leptotrichia*: diferencia significativa entre 3 y 60 meses ( $p=0,027$ ).
- *Moraxella*: diferencia significativa entre 1 y 60 meses ( $p=0,001$ ), entre 3 y 60 meses ( $p=0,007$ ) y entre 12 y 60 meses ( $p=0,001$ ).
- *Corynebacterium*: diferencia significativa entre 3 y 60 meses ( $p=0,024$ ).
- *Schaalia*: diferencia significativa entre 1 y 60 meses ( $p=0,001$ ) y entre 3 y 60 meses ( $p=0,033$ ).
- *Chryseobacterium*: diferencia significativa entre 1 y 60 meses ( $p=0,018$ ).
- *Klebsiella*: diferencia significativa entre 3 y 60 meses ( $p=0,001$ ) y entre 12 y 60 meses ( $p<0,001$ ).
- *Cutibacterium*: diferencia significativa entre 1 y 60 meses ( $p=0,006$ ), entre 3 y 60 meses ( $p=0,003$ ) y entre 12 y 60 meses ( $p<0,001$ ).
- *Staphylococcus*: diferencia significativa entre 12 y 60 meses ( $p<0,001$ ).



**Tabla 10:** Distribución de abundancia relativa de las diferentes especies por cada tiempo evaluado ordenados según la abundancia a 1 mes. Se han agrupado como “Otros” las especies con una abundancia relativa inferior a 1%. Se indica media (DE) en %.

ESPECIE	TIEMPO	1 mes	3 meses	12 meses	60 meses	Valor p *
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		9,82 (16,46)	3,67 (5,30)	3,98 (4,59)	3,31 (7,08)	0,077
<i>Fusobacterium nucleatum</i>		7,43 (8,80)	8,95 (8,09)	11,56 (11,07)	10,10 (11,92)	0,637
<i>Prevotella oris</i>		4,81 (8,19)	2,94 (3,85)	4,06 (7,28)	2,11 (3,21)	0,667
<i>Prevotella intermedia</i>		4,47 (5,22)	3,95 (4,05)	4,18 (4,63)	5,60 (9,47)	0,965
<i>Veillonella parvula</i>		4,1 (4,62)	5,28 (4,91)	3,22 (3,20)	2,31 (3,41)	0,031 **
<i>Neisseria mucosa</i>		3,50 (5,16)	2,45 (3,46)	1,97 (4,44)	1,11 (2,68)	0,036 **
<i>Prevotella melaninogenica</i>		3,36 (5,59)	3,20 (4,30)	1,62 (2,18)	0,66 (1,04)	0,030 **
<i>Treponema sp. OMZ 804</i>		2,19 (4,23)	1,10 (1,55)	0,87 (1,28)	3,83 (6,37)	0,747
<i>Prevotella denticola</i>		2,02 (4,30)	2,10 (3,39)	2,00 (3,87)	0,86 (1,85)	0,472
<i>Streptococcus gordonii</i>		1,79 (2,25)	1,53 (2,19)	1,66 (2,86)	0,44 (0,97)	0,004 **
<i>Streptococcus oralis</i>		1,59 (2,21)	1,32 (1,50)	1,20 (1,06)	1,28 (1,69)	0,455
<i>Treponema denticola</i>		1,63 (3,11)	1,12 (1,48)	2,18 (3,09)	4,99 (7,88)	0,467
<i>Rothia dentocariosa</i>		1,51 (2,15)	0,78 (1,16)	2,74 (7,01)	1,27 (2,15)	0,709
<i>Moraxella osloensis</i>		1,77 (5,04)	0,20 (0,37)	1,60 (4,28)	0,00 (0,00)	<0,001 **
<i>Prevotella enoeca</i>		1,54 (3,23)	0,94 (1,39)	1,91 (4,88)	1,76 (2,92)	0,911

ESPECIE	TIEMPO	1 mes	3 meses	12 meses	60 meses	Valor p *
<i>Actinomyces sp. oral taxon 171</i>		1,42 (1,89)	1,66 (3,92)	1,35 (1,82)	0,84 (1,61)	0,069
<i>Streptococcus sanguinis</i>		1,30 (1,65)	1,38 (1,73)	0,85 (0,83)	0,50 (0,79)	0,024 **
<i>Actinomyces oris</i>		1,22 (1,91)	1,33 (3,07)	1,27 (2,10)	0,63 (1,29)	0,044 **
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>		1,08 (1,54)	0,73 (1,21)	0,33 (0,56)	0,32 (0,68)	0,029 **
<i>Streptococcus mitis</i>		1,19 (1,72)	4,03 (10,87)	1,81 (2,23)	4,05 (6,49)	0,916
<i>Selenomonas sputigena</i>		1,04 (1,91)	0,95 (2,01)	0,28 (0,35)	0,33 (0,79)	0,070
<i>Treponema sp. OMZ 838</i>		0,99 (1,90)	0,51 (0,82)	0,29 (0,51)	1,85 (2,41)	0,254
<i>Rothia aeria</i>		0,92 (1,85)	0,34 (0,41)	1,10 (2,58)	0,81 (1,47)	0,579
<i>Parvimonas micra</i>		0,96 (1,55)	1,26 (1,48)	0,91 (1,27)	0,75 (1,54)	0,088
<i>Schaalia odontolytica</i>		0,86 (0,88)	0,41 (0,46)	0,36 (0,51)	0,13 (0,18)	0,002 **
<i>Neisseria subflava</i>		0,83 (1,20)	1,44 (2,67)	0,86 (1,33)	0,45 (1,18)	0,018 **
<i>Actinomyces viscosus</i>		0,84 (1,08)	0,78 (1,76)	0,56 (0,77)	0,41 (0,66)	0,216
<i>Corynebacterium matruchotii</i>		0,77 (1,09)	2,42 (4,31)	0,75 (1,02)	1,54 (4,36)	0,049 **
<i>Campylobacter gracilis</i>		0,75 (1,73)	0,75 (1,06)	0,63 (0,71)	0,64 (1,26)	0,443
<i>Filifactor alocis</i>		0,77 (1,76)	0,57 (1,01)	0,98 (1,43)	1,12 (1,38)	0,671
<i>Lautropia mirabilis</i>		0,70 (1,19)	0,38 (0,86)	0,80 (1,34)	0,45 (0,73)	0,688
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>		0,64 (0,79)	1,38 (2,80)	0,45 (0,80)	0,74 (1,93)	0,640

ESPECIE	TIEMPO	1 mes	3 meses	12 meses	60 meses	Valor p *
<i>Actinomyces naeslundii</i>		0,68 (1,09)	0,85 (2,10)	0,59 (1,03)	0,43 (0,80)	0,176
<i>Prevotella jejuni</i>		0,63 (0,73)	1,06 (1,77)	0,84 (1,33)	0,28 (0,48)	0,013 **
<i>Rothia mucilaginosa</i>		0,64 (0,94)	0,69 (0,90)	0,74 (1,03)	5,3 (22,3)	0,182
<i>Selenomonas sp. oral taxon 126</i>		0,61 (1,38)	0,63 (1,34)	0,09 (0,11)	0,30 (0,78)	0,444
<i>Haemophilus haemolyticus</i>		0,61 (0,93)	0,49 (1,09)	0,80 (1,50)	0,88 (2,13)	0,168
<i>Streptococcus intermedius</i>		0,56 (0,71)	0,57 (0,62)	0,60 (1,05)	1,86 (4,71)	0,486
<i>Tannerella sp. oral taxon HOT-286</i>		0,54 (1,17)	0,51 (0,84)	0,31 (0,33)	0,17 (0,26)	0,136
<i>Prevotella scopos</i>		0,53 (0,65)	0,56 (0,65)	0,30 (0,32)	0,24 (0,45)	0,183
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		0,51 (0,72)	1,05 (2,74)	1,43 (3,75)	8,36 (13,61)	0,106
<b>Otras</b>		26,87 (0,07)	33,74 (0,15)	35,99 (0,15)	26,96 (0,14)	-

\*: Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

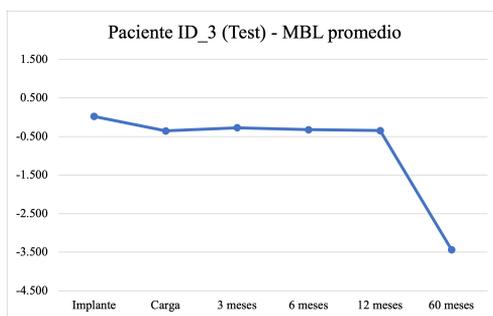
\*\* : Comparaciones por pares de tiempos mediante corrección de Bonferroni significativas:

- *Veillonella parvula*: diferencia significativa entre 3 y 60 meses (p=0,025).
- *Neisseria mucosa*: diferencia significativa entre 3 y 60 meses (p=0,048).
- *Streptococcus gordonii*: diferencia significativa entre 1 y 60 meses (p=0,003) y entre 3 y 60 meses (p=0,043).
- *Moraxella osloensis*: diferencia significativa entre 1 y 60 meses (p<0,001), entre 3 y 60 meses (p=0,002) y entre 12 y 60 meses (p<0,001).
- *Streptococcus sanguinis*: diferencia significativa entre 1 y 60 meses (p=0,043).

- *Capnocytophaga gingivalis*: diferencia significativa entre 1 y 60 meses ( $p=0,032$ ).
- *Schaalia odontolytica*: diferencia significativa entre 1 y 60 meses ( $p=0,001$ ).
- *Neisseria subflava*: diferencia significativa entre 3 y 60 meses ( $p=0,021$ ).
- *Corynebacterium matruchotii*: diferencia significativa entre 3 y 60 meses ( $p=0,038$ ).
- *Prevotella jejuni*: diferencia significativa entre 3 y 60 meses ( $p=0,029$ ) y entre 12 y 60 meses ( $p=0,039$ ).

La relación entre los datos microbiológicos y de nivel de hueso alrededor del implante mostró algunos datos interesantes. Así, si nos centramos en los 4 pacientes que tuvieron pérdidas óseas importantes en el periodo comprendido entre los 12 y los 60 meses (3 pacientes del grupo Test: n° 3, 20 y 25; y 1 paciente del grupo Control: n° 4), podemos observar la evolución de la composición del microbioma del surco en estos casos.

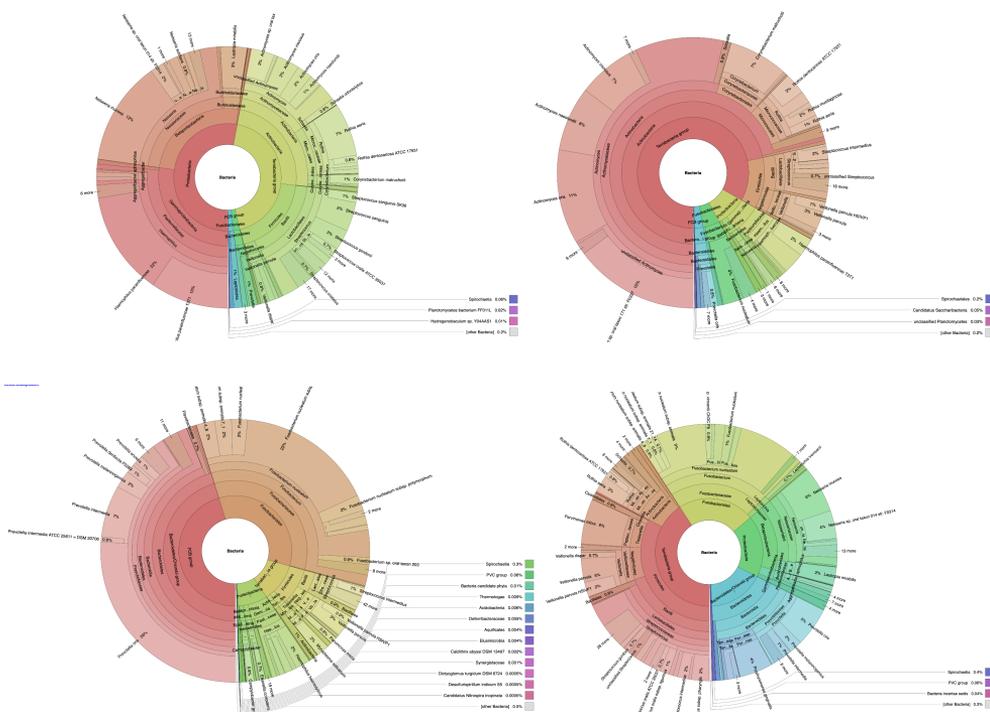
Así, podemos utilizar el paciente 3 como ejemplo ilustrativo, por ser el implante que más hueso perdió a 60 meses, como muestra la **Figura 22**, reproducida aquí nuevamente: a 60 meses el nivel de hueso marginal se encontraba aproximadamente a 3,5



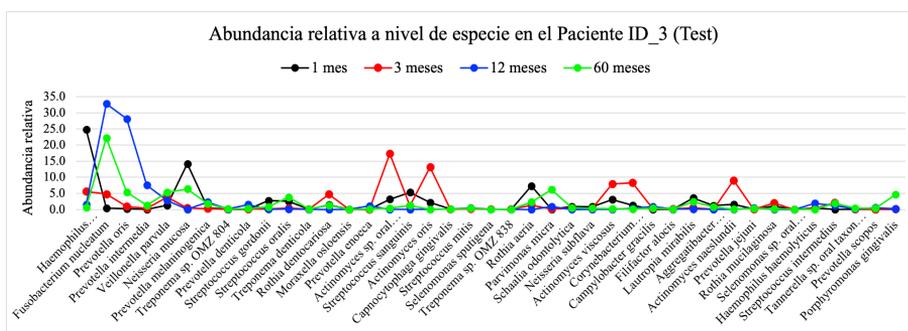
mm por debajo del hombro del implante, si bien había estado estable alrededor de 0,5 mm, al menos, hasta el primer año. Posiblemente, la pérdida ósea distal de este implante esté vinculada a la extracción del diente posterior al implante.

Microbiológicamente, es de destacar que la pérdida ósea de este paciente no está asociada con el desarrollo de los complejos rojos y naranjas de Socransky, como muestran los gráficos de jerarquía taxonómica Krona (**Figura 31**). En el análisis detallado a nivel de especie y tiempo (**Figura 32**), podemos observar que, si bien *Fusobacterium nucleatum* (complejo naranja) es la especie más abundante a los 12 y 60 meses, su abundancia relativa es menor a los 60 que la encontrada a los 12 meses. No podemos olvidarnos que, en el total de la muestra de pacientes, *Fusobacterium nucleatum* es la especie más abundante a partir del segundo seguimiento (3 meses) (**Tabla 10**). Otras especies que en el cómputo global de pacientes se reducen, sin embargo, en este paciente concreto a 60 meses son más abundantes que en otros tiempos, incluyendo *Prevotella oris*, *Veillonella parvula*, *Neisseria mucosa* y *Parvimonas micra*.

En el caso de *Porphyromonas gingivalis*, este es uno de los pocos pacientes en que aumenta con el tiempo.

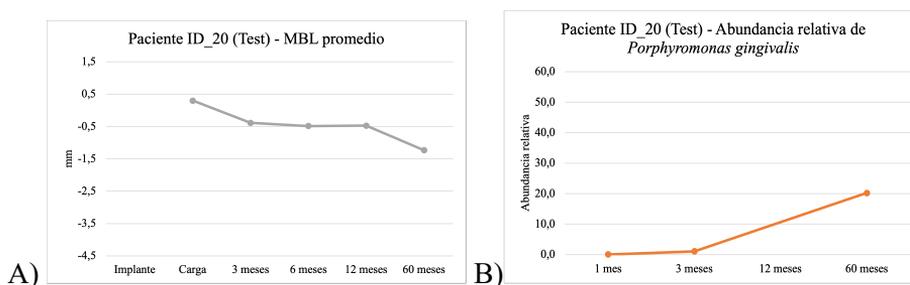


**Figura 31:** Gráficos de jerarquía taxonómica Krona representando la abundancia relativa de las diferentes bacterias hasta el nivel de especie a A) 1, B) 3, C) 12 y D) 60 meses de seguimiento en el paciente número 3.



**Figura 32:** Representación en gráfico de líneas de la abundancia relativa en cada tiempo de evaluación a nivel de especie en el paciente 3. No se representan las especies que tuviesen menos de un 1% de abundancia relativa.

De forma similar, podemos analizar los pacientes en los que la especie *Porphyromonas gingivalis* aumentó a 60 meses. Esto ocurrió en un total de 5 pacientes en los que la abundancia relativa de esta especie aumentó por encima del 10%, haciendo que globalmente la diferencia fuera estadísticamente significativa, pasando de 0,51 (0,07) % a 8,36 (13,61) %. En esos pacientes concretos, al igual que en el mencionado anteriormente, el incremento de abundancia relativa de *Porphyromonas gingivalis* estuvo acompañado de un aumento en el nivel de pérdida de hueso alrededor de los implantes, si bien esta correlación no fue estadísticamente significativa. Así, por ejemplo, si observamos el paciente número 20, tras la remodelación inicial post-carga hasta los 3 meses, el nivel óseo se mantuvo estable alrededor de -0,5 mm. Sin embargo, en el seguimiento a 60 meses el nivel óseo bajó hasta -1,232 mm. De forma simultánea, la abundancia relativa de *Porphyromonas gingivalis* aumentó desde 1,060 % a los 3 meses a 20,187 % a los 60 meses (**Figura 33**).



**Figura 33:** Representación en gráfico de líneas de A) la evolución del nivel de hueso marginal en el paciente número 20 y B) la abundancia relativa de *Porphyromonas gingivalis* en cada tiempo de evaluación.



# *DISCUSIÓN*



## 7. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue comparar la pérdida marginal ósea alrededor de implantes con una superficie recubierta de multifosfonato después de un protocolo de carga temprana o convencional; es decir, en los que se inició la fase protésica ya sea 4 u 8 semanas después de la colocación del implante mediante la toma de impresiones. Las coronas se colocaron 2 semanas después, momento en que sería cuando realmente comenzó la carga oclusal funcional. También hemos querido evaluar la seguridad de esta superficie en un protocolo de carga temprana, ya que anteriormente había sido descrita sólo en protocolos de carga convencional. La pérdida ósea marginal se comparó entre ambos grupos en varios momentos hasta 5 años después de la entrega de la prótesis definitiva. Nuestros resultados generales mostraron que un protocolo de carga temprana iniciado 4 semanas después de la colocación de implantes con una superficie recubierta de multifosfonato, no afectó a la pérdida marginal ósea en comparación con la carga iniciada después de 8 semanas, para cualquier periodo hasta 5 años después de la entrega de la prótesis.

En primer lugar, debemos mencionar que, hasta donde hemos podido comprobar, existe un único estudio clínico previo que ha evaluado la seguridad y eficacia de implantes dentales con la superficie empleada en nuestro estudio. En él se evaluó a un grupo de 23 pacientes durante un año. El protocolo de carga protésica implicaba una espera de hasta 3 meses para los implantes colocados en la mandíbula y 6 meses para los implantes colocados en el maxilar superior. Tras un año de evaluación no observaron ningún fracaso. Tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de hueso marginal. Un análisis adicional de los datos obtenidos en dicho estudio concluyó que la modificación superficial aportaba mayores ventajas respecto a la pérdida de hueso marginal en los pacientes fumadores, es decir, en los que el metabolismo óseo puede estar más comprometido (Esposito et al. 2013). En

el presente estudio hemos observado un fracaso tras la carga en cada grupo de protocolo de carga.

El Consenso de Pisa de 2008, bajo el auspicio de la mayor asociación del implantólogos orales del mundo, la ICOI (International College of Oral Implantologists), determinó que, entre los criterios de éxito de un implante, la pérdida ósea marginal alrededor del cuello del implante no podía ser mayor a 2 mm tras el primer año de la carga protésica (Misch et al. 2008). No obstante, el equipo de Cirugía Bucal e Implantología de la Universidad de Granada en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral y, concretamente, uno de los directores de la misma, que participó activamente en aquel consenso, de forma posterior ha discutido esta afirmación argumentando que no debería ser aceptable ninguna pérdida ósea marginal superior a 0 mm. Partiendo de esta premisa, se ha corroborado que pérdidas óseas mínimas de forma temprana pueden tender fácilmente a evolucionar a periimplantitis, según la definición actual de la misma (Berglundh et al. 2018). Así, diversos estudios han relacionado de forma estadísticamente significativa que una pérdida ósea en los seis primeros meses de alrededor de 0,45 mm se asocia con una pérdida ósea alrededor del implante mayor a 2 mm tras un año de seguimiento en el 97,5% de los casos (Galindo-Moreno et al. 2015, 2022a), lo cual quedó corroborado también en los resultados del presente estudio. En base a estas consideraciones iniciales, debemos plantear la discusión del presente trabajo.

En primer lugar, debemos exponer que, en el presente estudio, la cirugía de implantes se ha realizado en una única fase, es decir, colocando el pilar de cicatrización en el mismo momento que la cirugía de colocación de implantes. Aunque se trata de un concepto poco discutido en la literatura actual ya que parece claro que no hay una influencia clara respecto a este factor, la motivación principal para realizar este protocolo en el presente estudio fue el de proveer un marco temporal estable para todos los casos y principalmente para el grupo de carga temprana. En este grupo pretendíamos realizar la carga

de forma lo más cercana posible a las 4 semanas. Si en esta fecha, 4 semanas, hubiésemos tenido que realizar la cirugía de segunda fase, esperar la cicatrización correcta de los tejidos blandos y tomar la impresión, probablemente, la carga efectiva del implante hubiese ocurrido, no a las 5-6 semanas como en el protocolo desarrollado, si no más cercano a las 8-9, por los propios tiempos de espera. Además, algunos estudios demuestran que este procedimiento genera una menor pérdida ósea que las cirugías de implantes realizadas en dos fases (Ho et al. 2016).

Comparar nuestros resultados principales con la literatura disponible basada en el tiempo de carga es un desafío debido a los diferentes criterios establecidos para categorizarlos. La definición más actualizada de “carga temprana” se refiere a un implante con prótesis en oclusión con la dentición antagonista entre 1 semana y 2 meses después de la colocación del implante (Morton et al. 2018), lo que en realidad es un período de tiempo amplio. Un factor fundamental que diferencia entre carga inmediata y temprana es la importancia biomecánica y biológica del concepto de estabilidad primaria y el de estabilidad secundaria. La estabilidad secundaria, lograda mediante la osteointegración, que es un concepto dinámico, es lo que finalmente asegura la estabilidad y el éxito a largo plazo del implante. En el tiempo intermedio entre la estabilidad primaria (mecánica) y la estabilidad secundaria (biológica), hay un momento crítico en el que el implante se encuentra en una fase comprometida que oscila entre 1 y 4 semanas (Raghavendra et al. 2005). Así, aunque la definición de carga temprana va de 1 a 8 semanas (Morton et al. 2018), en realidad el tiempo entre 1 y 4 semanas es el periodo en el que más cambios ocurren y el implante es menos estable.

Así, cuando consideramos las conclusiones de estudios que comparan distintos protocolos de carga, encontramos trabajos que preconizan la carga temprana argumentado que la demora en la carga de los implantes puede incrementar la pérdida ósea marginal por la atrofia ósea que ocurre debido al desuso (Bilhan

et al. 2010). Además, si se tienen en cuenta las ventajas que se obtienen de una carga temprana, podríamos pensar que este tipo de protocolos deberían ser de aplicación común. Sin embargo, aunque la elección del protocolo de carga tiene una relevancia importante en la supervivencia temprana del implante, la influencia que ejerce el protocolo de carga sobre la pérdida ósea marginal no ha sido estudiada con la misma intensidad, a pesar de la relevancia de este último parámetro para la supervivencia del implante a largo plazo.

En algunos estudios, la carga del implante se realiza de una forma bastante más temprana que en el caso del estudio actual. Por ejemplo, Salvi y colaboradores compararon implantes cargados a las dos semanas (grupo Test) con implantes cargados a las 6 semanas (grupo Control) en un total de 27 pacientes. Los implantes se colocaron para restaurar molares mandibulares con coronas unitarias cementadas. Dos implantes del grupo Test y uno del grupo Control no estaban totalmente integrados en el momento de la conexión del pilar de cicatrización, que se realizó una semana antes de la carga, es decir, 1 semana tras la colocación del implante en el grupo Test y 5 semanas después de la colocación del implante en el grupo Control. Respecto a la pérdida de hueso marginal, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $0,57 \pm 0,49$  frente a  $0,72 \pm 0,50$  mm) (Salvi et al. 2004). Dentro de las similitudes entre este estudio de Salvi y el actual, las diferencias también son claras respecto al tiempo en que se conectaron los pilares protésicos en el grupo Test, solo una semana después de la cirugía. Otras diferencias incluyen la localización, que en el estudio de Salvi fue exclusivamente mandibular, más denso, a diferencia de nuestro estudio en el que la mayoría de los implantes se colocaron en el maxilar. Además, es importante reseñar que la estabilidad primaria después de sólo una semana de curación ósea todavía se mantiene en niveles altos ya que la remodelación ósea aún no está en plena actividad. Por último, en el estudio de Salvi y colaboradores, los implantes nunca fueron sometidos a repetidas fuerzas antitorsión, por ejemplo, como en nuestro

estudio, para la realización de impresiones, ya que las coronas estaban cementadas. Así, se podría decir que, en nuestro caso, los implantes fueron sometidos a mayores exigencias mecánicas con el movimiento más potencialmente deletéreo en el momento de la transición de la estabilidad primaria a la secundaria, que es el movimiento de giro.

En un estudio diferente sobre implantes unitarios sometidos a carga inmediata, carga temprana a las 3 semanas o convencional a los 4 meses no hubo diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las medidas de resultado hasta 1 año después de la carga (Grandi et al. 2015), tal y como encontramos en nuestro estudio, tanto a 1 como a 5 años. En términos de complicaciones, nuestro estudio también muestra resultados similares a los del estudio de Grandi, en el que dos implantes fallaron, uno en el grupo de carga inmediata y otro en el de carga temprana. En nuestro estudio hubo fracasos previos a la carga en el grupo Test, mientras que en ambos grupos hubo un fracaso tras la carga, que en ambos casos ocurrió alrededor del seguimiento a 3 meses. Resultados similares fueron también observados a 6 meses tras un protocolo de carga temprana 3 semanas después de la colocación de los implantes, en este caso sólo en mandíbula (Bornstein et al. 2010). Algunos de los implantes de este estudio, como en el de Salvi, también giraron en el momento de la carga. En esos casos, al igual que en el presente estudio, se dejaban sin carga durante más tiempo. En nuestro estudio, cuando esto ocurrió, se decidió excluir esos implantes de análisis posteriores. Por tanto, aunque las tasas de supervivencia final pueden variar, hay que tener en cuenta esta circunstancia.

Otros estudios consideran carga temprana incluso después de 6 semanas tras la colocación del implante. Así, podemos citar, por ejemplo, estudios en los que se utilizaron implantes con conexión cónica interna, como en el estudio actual, y en los que se encontraron resultados también similares. Es el caso del estudio de Mitsias y colaboradores que encontraron pérdidas de hueso marginal de

0,19 ± 0,44 mm en implantes cargados inmediatamente (2 días tras la colocación de los implantes), de 0,18 ± 0,66 mm en implantes con carga temprana (a las 6 semanas) y de 0,25 ± 0,28 mm en implantes con carga convencional (a los 3 meses) (Mitsias et al. 2018). De forma similar, una serie de estudios multicéntricos liderados por el grupo en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral utilizó también un protocolo de carga de 6 semanas y se encontraron resultados similares en términos de supervivencia y pérdida marginal ósea en los distintos seguimientos publicados: 1 año (Galindo-Moreno et al. 2012), 3 años (Maiorana et al. 2015) y 5 años (Galindo-Moreno et al. 2017). Existen otros estudios con los mismos tiempos de carga (alrededor de 6 semanas) que también demuestran resultados similares tanto en eficacia clínica como mantenimiento óseo en comparación con protocolos convencionales (Kim et al. 2016; Makowiecki et al. 2017). Esto es así, a nuestro entender, porque la curación del hueso es completa después de 6 semanas (Berglundh et al. 2003) por lo que todos estos protocolos son totalmente fiables desde el punto de vista biológico y clínico.

Esto se demuestra también si analizamos la literatura en este sentido considerando específicamente los resultados a largo plazo. Por desgracia, la mayoría de los estudios disponibles en la literatura sobre carga temprana de implantes unitarios, no así de implantes múltiples, reportan sus resultados a tiempos inferiores a los reportados en este trabajo. Aun así, podemos analizar algunos datos interesantes y realizar las comparativas oportunas con los resultados obtenidos en el actual estudio. Una de estas series incluye la ya mencionada sobre implantes de 3,30 mm de diámetro para restaurar incisivos inferiores o laterales superiores y que reportó sus resultados a 1, 3 y 5 años tras carga a 6 semanas (Galindo-Moreno et al. 2012, 2017; Maiorana et al. 2015). En último término, el cambio en el nivel de hueso marginal tras 5 años fue de tan sólo -0,11 (0,95) mm comparado con los niveles en el momento de la inserción del implante (Galindo-Moreno et al. 2017). En nuestro estudio, en el

que no se cargaron los implantes a 6 semanas si no a 4 u 8, el nivel de cambio calculado entre la colocación de la prótesis y el seguimiento a 60 meses fue de -0,49 (0,77) mm. Aunque mayor que en el caso anterior, podemos mencionar un par de motivos para esta diferencia. La primera posible explicación es que en nuestro estudio evaluamos principalmente premolares y molares superiores, con unos requerimientos mecánicos que no se dieron en el caso del estudio indicado, en que sólo rehabilitaron incisivos inferiores e incisivos laterales superiores. Además, en nuestro caso, como se ha mencionado, un implante sufrió una pérdida elevada, posiblemente asociada a la remodelación post-extracción del diente vecino. Siendo en nuestro caso el tamaño muestral bastante inferior, estos cambios puntuales tienen una influencia mayor en los descriptivos finales. También en una serie de estudios con carga temprana a 6 semanas y protocolo a una fase se reportaron sus resultados a distintos tiempos, desde 6 meses (Cannizzaro et al. 2008), a 4 (Cannizzaro et al. 2012) y 9 años (Cannizzaro et al. 2018). Estos estudios fueron realizados con implantes cortos, aunque no queda claro exactamente qué medida de implantes se utilizó ya que en el primero se reporta 7 mm, 6,5 mm en el segundo y 6,6 mm en el tercero. También se utilizó un protocolo “*flap-less*”, lo cual presenta diferencias fundamentales con nuestro protocolo. En cualquier caso, el cambio entre la carga y el último seguimiento fue de 0,46 (0,45) mm, muy similar al nuestro.

Si analizamos un grupo de estudios sobre implantes cargados de una forma más cercana a la nuestra, incluyendo la colocación de pilares de cicatrización en el momento de la inserción del implante, podemos encontrar valores similares a los nuestros. Así, Nicolau y colaboradores empleando implantes con modificación superficial convencional, SLActive®, observaron en la rehabilitación a 28-34 días de molares superiores e inferiores una pérdida de hueso marginal de  $0,57 \pm 0,83$  mm tras 36 meses de seguimiento. La carga, eso sí, fue realizada en primera instancia con prótesis temporales (Nicolau et al. 2013). Arghami y colaboradores, utilizando implantes con recubrimiento de

hidroxiapatita y carga a 3 semanas, encontraron resultados más similares a los nuestros, con pérdidas de hueso marginal promedio de mesial y distal a 2 años de  $0,417 \pm 0,081$  mm y de  $0,511 \pm 0,094$  a 7 años en un total de 22 implantes. Tampoco encontraron que ninguna de las variables clínicas consideradas tuviese efecto sobre el resultado final (Arghami et al. 2021). También con un protocolo a una fase y carga a 3 semanas, Cooper y colaboradores demostró pérdidas de hueso marginal 3 años tras la carga de  $0,42 \pm 0,59$  mm (Cooper et al. 2007). Niveles mayores fueron observados por Saglanmak y colaboradores a 5 años empleando exactamente el mismo implante empleado por nosotros, pero sin la modificación superficial, es decir, implantes MIS C1. Estos datos sin embargo no son comparables a los nuestros al haber combinado en el análisis final los datos de implantes unitarios rehabilitados con Ti-base y los datos de implantes múltiples rehabilitados con aditamentos tipo multiunit. Además, aun indicando que se realizó carga temprana, los tiempos efectivos de carga fueron más cercanos a lo que nosotros hemos considerado carga convencional, es decir,  $7,17 \pm 1,2$  semanas (Saglanmak et al. 2021). Por todo ello, recientemente Pommer y colaboradores han concluido tras analizar de forma agrupada los datos de 29 estudios y un total de 965 implantes que, a largo plazo, los resultados en términos de remodelación ósea marginal no son diferentes entre implantes cargados de forma convencional o implantes cargados de forma temprana (Pommer et al. 2021). Aun así, debe mantenerse cierta precaución considerando otros factores que pueden ejercer alguna influencia potencialmente relevante como el sustrato óseo específico o la superficie del implante u otras variables clínicas de interés y que en el presente estudio también han sido evaluadas.

En el caso del estudio actual, no se han observado diferencias en cuanto a ninguna de las otras variables analizadas. Así, los niveles de hueso marginal en los dientes adyacentes no cambiaron significativamente con el tiempo. También en relación con esto, el índice de papila evaluado a lo largo del tiempo

mejoró claramente desde la carga hasta el año de seguimiento, ya que la papila interproximal depende principalmente de los dientes naturales adyacentes (Roccuzzo et al. 2018). Sin embargo, cabe destacar que a los 5 años el índice de papila empeoró, aunque no hasta niveles excesivamente negativos. En general, los pacientes no fueron seguidos por nosotros desde la visita de 12 meses hasta la de 60, de tal forma que, en ocasiones, algunos de nuestros pacientes presentaban pobre higiene oral, pudiendo ser este uno de los motivos causantes del empeoramiento del índice de papila. Esto no tuvo relación con la inclusión de algunos pacientes fumadores. No excluimos a estos pacientes de nuestro estudio, a pesar de tratarse de un protocolo de carga bastante exigente, porque estudios clínicos previos que utilizaron la misma superficie utilizada en el estudio actual, como se ha indicado anteriormente, observaron que los fumadores en realidad se beneficiaron más de haber recibido implantes con esta superficie (Esposito et al. 2013). Posiblemente podamos encontrar la explicación para esto en que los pacientes fumadores podrían tener afectado su potencial de cicatrización ósea, por lo que el hecho de utilizar una superficie de implante que estimula la curación ósea ayudaría a sobrepasar los posibles efectos negativos de su hábito tabáquico.

En nuestro estudio, no hemos encontrado influencia de ninguna otra variable en la pérdida marginal ósea, ni siquiera el grosor de la mucosa periimplantaria o la altura del pilar transmucoso. Como se ha descrito en el apartado correspondiente, el grosor de la mucosa en el grupo Test al momento de la toma de impresiones fue menor que en el grupo Control, de forma estadísticamente significativa. Esto podría deberse a que tan sólo 4 semanas tras la realización de la incisión para la colocación del implante, la maduración de los tejidos pudiera ser menor, estando aún en fase de contracción. Este menor grosor de mucosa fue el motivo para que en el grupo Test se utilizaran más pilares de 1,5 mm, lo que a su vez dio lugar a una mayor longitud de corona. Sin embargo, la ratio corona-implante no fue diferente entre grupos.

Esto fue así porque para el cálculo de esta ratio sumamos la longitud del aditamento a la longitud de la corona ya que, al tratarse de implantes unitarios con coronas atornilladas de forma directa al implante, el aditamento y la corona constituyen una pieza única. Hay que tener en cuenta que varios estudios recientes están destacando que el efecto del espesor de la mucosa sobre la pérdida ósea se vuelve irrelevante cuando la altura del pilar transmucoso es alta (Pico et al. 2019; Spinato et al. 2019). Estudios previos del grupo en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral y otros también hacen referencia a un punto de corte de 2 mm de pilar transmucoso para prevenir la pérdida marginal ósea (Galindo-Moreno et al. 2014, 2022b, 2023; Borges et al. 2018, 2019). Finalmente, y quizás lo más importante, hay que recordar que no todos los pilares transmucosos se comportan de la misma manera en relación al sellado que consiguen en la conexión con el implante o en la conexión entre el aditamento y la corona, ni respecto a su estabilidad mecánica (Piattelli et al. 2003; Tallarico et al. 2017, 2018). En cualquier caso, se debe mencionar que, como se ha indicado, la mayoría de los estudios en este campo se han realizado con implantes múltiples sobre los que se colocan los pilares transmucosos y, a su vez, sobre estos, se atornillan las prótesis. Esto diferencia en un aspecto fundamental el estudio del aditamento sobre implantes unitarios, ya que, en estos casos, en que la prótesis se cementa al aditamento de forma extraoral sobre una base de titanio, en laboratorio, el componente supra-implante se comporta como una unidad (Afrashtehfar et al. 2022). En los casos de implantes múltiples, existen 2 interfases, una entre implante y aditamento y otra entre aditamento y coronas. Al ser esta última la más inestable, es fundamental alejarla lo máximo posible del entorno óseo.

Uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral, que de hecho pensamos que le otorga la mayor novedad, fue el de analizar, junto a la evolución de la pérdida marginal ósea de una serie de implantes con superficie de multifosfonato a lo largo del tiempo, las características de la microbiología

presente en el surco periimplantario de dichos implantes. Esto es así porque el estudio de la pérdida ósea marginal a lo largo del tiempo es un fenómeno de alto interés en Implantología por lo que determinar qué lo produce, si responde a razones fisiológicas o patológicas y donde está el umbral que diferencia este límite biológico entre la patología y la salud (Galindo-Moreno et al. 2015, 2022a) es de máxima importancia. Este concepto es tan importante en la Implantología moderna que su evolución marca el concepto de enfermedad, de modo que no puede existir periimplantitis sin la progresión de pérdida ósea marginal, aunque sí patología periimplantaria sin la presencia de ella (mucositis periimplantaria). Ambas formas de enfermedad periimplantaria han sido indefectiblemente asociadas a la presencia de patógenos microbiológicos, puesto que estos no pueden ser eliminados de la ecuación conceptual, ya que no existe la posibilidad biológica de una boca aséptica. Por tanto, debido a que el concepto actual de enfermedad define la patología periimplantaria como una enfermedad asociada a placa bacteriana (Berglundh et al. 2018), conocer la evolución del microbioma periimplantario es esencial para entender cuándo y por qué se podrían iniciar y perpetuar las enfermedades periimplantarias, única forma para poder entender cómo prevenirlas o resolverlas. Sin embargo, incluso con protocolos de tratamiento perfectamente establecidos, la literatura no consigue evidenciar el vínculo inequívoco de ningún agente patogénico con el desarrollo de estas enfermedades (Herrera et al. 2023).

La metodología para identificar a los miembros bacterianos asociados a las infecciones periimplantarias se ha basado en diferentes técnicas, que han progresado desde los cultivos anaeróbicos, intentando aislar microorganismos periodontales, hasta técnicas más avanzadas de detección molecular, cerradas o abiertas. Por lo tanto, ha existido una evolución en la descripción del microbioma periimplantario desde los inicialmente detectados cocos grampositivos y bacilos no móviles en la salud periimplantaria, pasando por una mayor presencia de cocos, bacilos móviles y espiroquetas en la mucositis

periimplantaria a las especies Gram negativas, móviles y anaerobias típicas en periimplantitis. Otras técnicas moleculares cerradas, como la reacción en cadena de la polimerasa y sus variantes, como la hibridación fluorescente *in situ* o la hibridación ADN-ADN en “*checkerboard*”, definieron una lista más precisa de bacterias detectadas en las infecciones periimplantarias, que a menudo implicaban a periodontopatógenos comunes. Por ejemplo, los miembros del clúster del "complejo rojo", formado principalmente por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, en sinergia con otras especies, muy en similitud con infecciones alrededor de dientes como la gingivitis o la periodontitis crónica. Sin embargo, estas técnicas moleculares cerradas conllevaban la preselección por parte del investigador de un conjunto de sondas genéticas o “primers” que dirigía la identificación bacteriana hacia taxones específicos, a menudo basados en conocimientos previos derivados de la periodontitis. Por lo tanto, clásicamente, hasta la aparición de las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (NSG), ha existido un sesgo de "selección", que técnicamente impedía la identificación de microbiota menos estudiada o "inesperada" (Padial-Molina et al. 2016; Belibasakis & Manoil 2021). El hecho en sí de eliminar el sesgo de selección es el motivo por el que nuestro estudio ha sido realizado utilizando un secuenciador Illumina 2000 Next/Seq, una técnica abierta de análisis de ADN, y hemos analizado el ADN total de las muestras, y no solo la región 16S del ADN ribosomal bacteriano, ya que con esto el análisis microbiológico es mucho más completo y profundo, y no sólo se circunscribe a la identificación de bacterias, sino que también detecta la presencia de virus u hongos, y también ADN del huésped. En cualquier caso, en el estudio presente, hemos excluido los datos no bacterianos para centrarnos en lo que más comúnmente se ha discutido en la literatura.

Con las tecnologías diagnósticas actuales que manejamos, todo agente microbiológico se ha podido aislar en toda situación clínica, desde salud

periimplantaria a periimplantitis. Baas-Becking y Beijerinck acertadamente dijeron: "Todo está en todas partes, pero el entorno selecciona" (de Wit & Bouvier 2006). En este sentido, nuestro análisis microbiológico detectó la presencia de un total de 4740 especies distintas, organizadas en 1290 géneros, pertenecientes a 38 filos distintos. De estos 38 filos, solamente la mitad, concretamente 19 (aquellos que mostraron una abundancia relativa superior al 0,01%), representaban el 99,97% del total de las bacterias presentes en las muestras de nuestros pacientes. Por lo tanto, hay otros 19 filos que no hemos representado en nuestros datos finales por su baja abundancia relativa. En este mismo sentido, de los 1290 géneros encontrados, solo 29 de ellos, aquellos con una abundancia relativa superior al 0,5%, representaban el 93,19% de la población bacteriana, y sólo analizamos las especies con una abundancia relativa superior al 1%, en total 41 de ellas, que representan el 73,13% de la muestra bacteriana.

En nuestro estudio, a nivel de los filos bacterianos, solo uno de ellos, *Candidatus Saccharibacteria*, mostró diferencias significativas, disminuyendo considerablemente a lo largo del seguimiento, concretamente entre 1 y 60 meses (0,51 (0,72) % vs. 0,05 (0,14) %;  $p < 0,001$ ) y entre 3 y 60 meses (0,19 (0,23) % vs. 0,05 (0,14) %;  $p = 0,006$ ). Debido a que el principio fundamental de la periodontitis se aplica igualmente bien a la periimplantitis, es decir, que la periimplantitis se trata de una infección endógena, polimicrobiana y oportunista (Charalampakis & Belibasakis 2015), *Candidatus Saccharibacteria* debería estar aumentado, ya que esta familia de bacterias ultra-pequeñas aumenta en la enfermedad periodontal. Una revisión sistemática indicó la asociación moderada de 17 especies pertenecientes, entre otros, a los filos *Candidatus Saccharibacteria*, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes y el dominio Archaea con el desarrollo y progresión de la enfermedad periodontal (Pérez-Chaparro et al. 2014). Es importante remarcar que "*Candidatus Saccharibacteria*" ha sido propuesto

como nuevo nombre para la familia de bacterias ultra-pequeñas TM7, basándose en el análisis genómico que sugería que estas bacterias consumen principalmente compuestos azucarados (Bor et al. 2019). Bajo la denominación *Candidatus Saccharibacteria* no hay estudios en la literatura que relacionen estas bacterias con implantes. Sin embargo, bajo la descripción TM7, aunque muy pocos, existen análisis que vinculen estas bacterias ultra-pequeñas con el desarrollo de patología periimplantaria. En ese sentido, Yu y colaboradores, publicaron la asociación de TM7 [G-1] con enfermedad periodontal pero no con periimplantitis en muestras tomadas en dientes e implantes, sanos y enfermos, de los mismos 18 pacientes (Yu et al. 2019). En otro estudio con una cohorte de pacientes tratados de periodontitis agresiva, analizando mediante tecnología NGS el biofilm de dientes e implantes, tanto sanos como enfermos, Sousa y colaboradores también reportaron que el filo TM7 solamente pudo ser identificado en casos de dientes con patología periodontal pero no en relación con implantes (Sousa et al. 2017).

En nuestra población, en cuanto a filos, Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria y Spirochaetes son los que tienen el peso de la población microbiológica global, perteneciendo a ellos casi el 95% de todas las bacterias detectadas en cualquiera de los tiempos analizados. Aunque se pueden observar variaciones en su abundancia relativa a lo largo del tiempo, cabe mencionar que no hubo diferencias significativas entre grupos en ninguno de los tiempos analizados, exceptuando al filo *Candidatus Saccharibacteria*, que disminuyó significativamente con el tiempo, como se ha expuesto. Esta composición del microbioma es muy similar a lo relatado en la mayoría de los estudios. Por ejemplo, en la población de Yu y colaboradores, citada anteriormente, su microbioma estaba dominado por Firmicutes (40,33%), seguido de Proteobacteria (17,45%), Fusobacteria (14,94%), Bacteroidetes (14,44%) y Actinobacteria (5,25%). De hecho, con la adición de Synergistetes, TM7 (*Saccharibacteria*) y Spirochaetes, el 99,6% del total de

taxones bacterianos detectados pertenecía a estos 8 filos (Yu et al. 2019). Sun y colaboradores reportaron también la prevalencia de 8 filos en una muestra de implantes sanos y enfermos, pre y post-tratamiento, resultando que Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Synergistetes y Spirochaetes se expresaban prioritariamente en el grupo pretratamiento, disminuyendo en el grupo postratamiento; sin embargo, mostraban una menor prevalencia en el grupo de implantes sanos. La presencia de Actinobacterias estaba elevada en el grupo de implantes sanos pero su presencia era escasa en el grupo de implantes patológicos pretratamiento (Sun et al. 2022).

En nuestra población, aunque se observa una disminución significativa de Candidatus Saccharibacteria y un patrón no significativo de disminución de Proteobacterias con el tiempo, y de un aumento de Bacteroidetes, Firmicutes y Spirochaetes a lo largo del seguimiento de los implantes, no se observaron dichas diferencias significativas, a diferencia de los citados estudios, quizás porque la mayoría de nuestros implantes no alcanzaron condiciones patológicas en su evolución. Cabe remarcar que el implante que mayor pérdida ósea experimentó estaba en relación de proximidad a un premolar que debió ser extraído por presentar una fractura vertical, por lo que dicha pérdida ósea podría deberse a la remodelación fisiológica post-extracción del diente vecino o al cambio microbiológico que se produce en su surco.

También es de destacar la ausencia de estudios de seguimiento del microbioma de los mismos implantes a tan largo plazo, lo que nos impide hacer las pertinentes comparaciones. En este sentido, en un estudio de seguimiento a dos años que evaluaba el microbioma en implantes afectados por mucositis periimplantaria en pacientes con historia previa de periodontitis, Lu y colaboradores relataron, como en nuestro caso (donde no había significación), un aumento significativo de los filos Bacteroidetes y Spirochaetes, pero al contrario de nuestro patrón de evolución, reportaron una disminución de los filos Firmicutes y Actinobacteria, lo que según los autores claramente indicaba

que el aumento de la microbiota patógena y la disminución de la microbiota comensal son causales de la disbiosis del microbioma submucoso (Lu et al. 2021).

De cualquier modo, al igual que observamos a nivel de filo, donde apenas hay diferencias entre unos estudios y otros, usando tecnologías de ADN abiertas, las diferencias en cuanto a la presencia de bacterias expresadas a nivel género o especie, son casi inexistentes, ya que como expresamos anteriormente, todas ellas están en todos los lugares, y su presencia selectiva se debe principalmente a las condiciones del microambiente (de Wit & Bouvier 2006). Por eso, por ejemplo, Li y colaboradores describieron que la abundancia de 14 géneros de bacterias en la mucositis periimplantaria es similar a la de los implantes sanos en las lesiones de mucositis menos inflamadas, mientras que es similar a la de la periimplantitis en las muestras de inflamación grave de la mucosa. En cualquier caso, ellos también describieron que los géneros reportados en su estudio se podían encontrar en todas las condiciones analizadas (Li et al. 2023). Sin embargo, el microbioma presente en las fases iniciales tras el establecimiento de la anchura biológica podría proporcionar información crucial para entender el desarrollo posterior de disbiosis y enfermedad periimplantaria. Algunos estudios han puntualizado que la aparición temprana de géneros como *Actinomyces*, *Bacteroidetes*, *Pseudomonas* o *Peptostreptococcaceae* podrían servir como pioneros para una comunidad microbiana periimplantaria patológica, aportando no solo nutrición, sino un pH adecuado y un entorno anaeróbico ideal para las bacterias patógenas, asociándose significativamente a géneros patógenos de *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Treponema* y *Prevotella* (Zheng et al. 2015). Por lo tanto, la presencia masiva de dichos géneros en surcos periimplantarios sanos podría ser indicativa de una posible posterior mucositis periimplantaria. La actuación temprana sobre estos microorganismos podría ser una medida preventiva eficaz en la preservación de salud periimplantaria. Lu y colaboradores, en un

estudio similar al de Li, de seguimiento a dos años evaluando mucositis periimplantaria en pacientes con historia previa de periodontitis, donde la primera medida de microbioma se estableció como en nuestro modelo, tras un mes de la colocación de la corona protésica establecieron que los géneros *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella* y *Treponema* aumentaron drásticamente en los dos primeros años tras la restauración, considerando tales bacterias como biomarcadores de mucositis periimplantaria (Lu et al. 2021). Si bien es cierto que nosotros reportamos pocos casos de patología periimplantaria, nuestros resultados apuntan a un aumento de algunos de estos géneros a lo largo del tiempo en los surcos periimplantarios, pero la presencia de estas bacterias no implicó el desarrollo de patología en la mayoría de nuestros implantes tras 5 años de evolución. Es cierto que la mayoría de los estudios clásicos (Van Assche et al. 2011), o actuales que comparan la composición microbiana entre implantes sanos y mucositis periimplantaria, encuentran significativamente más *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* en patología, lo que sugiere la fuerte asociación entre el "complejo rojo" periodontal y la mucositis periimplantaria tanto en estudios transversales como longitudinales, por lo que estas bacterias pueden ser actores clave en la inflamación periimplantaria. En nuestro caso, dos de estas especies, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia* ni siquiera muestran una abundancia relativa al 1% en ninguno de los tiempos de análisis y de las otras dos especies *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*, la primera de ellas se muestra en una abundancia relativa moderada, que tras los primeros meses aumenta progresivamente hasta los 60 meses, mientras que la segunda muestra una abundancia relativa pequeña, aumentando de modo drástico en el periodo comprendido entre el primer y el quinto año. No se aprecian diferencias significativas en estos cambios, posiblemente porque estos cambios se producen en muy pocos pacientes.

Si atendemos, además, a las teorías actuales de patología periodontal asociadas al poli sinergismo microbiano para el desarrollo de la disbiosis, algunos datos son de interés. Por ejemplo, se ha descrito que el crecimiento y la actividad de *Porphyromonas gingivalis* están modulados por una molécula difusible promotora del crecimiento procedente específicamente de *Veillonella parvula*, y no de otros microorganismos simbióticos. Hoare y colaboradores evidenciaron que *Veillonella parvula* permitía que bajas concentraciones de *Porphyromonas gingivalis* progresaran en los tejidos periodontales, promoviendo la pérdida ósea. Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales pero sin *Veillonella parvula*, *Porphyromonas gingivalis* fue incapaz de colonizar los tejidos periodontales (Hoare et al. 2021). En el presente análisis la abundancia relativa de *Veillonella parvula* disminuyó significativamente a lo largo del tiempo, lo cual podría explicar en parte la falta de actividad patológica de *Porphyromonas gingivalis*. En el paciente descrito detalladamente que más pérdida ósea sufrió, al contrario de lo que ocurre en promedio en el resto de pacientes, *Porphyromonas gingivalis* aumenta y también aumenta *Veillonella parvula*. Del mismo modo, la simple coadhesión o asociación física de diversas especies microbianas proporciona condiciones ideales para su desarrollo y actividad. Por ejemplo, el *Streptococcus gordonii* comensal promueve la colonización oral por *Porphyromonas gingivalis* a través de la unión entre fimbrias y proteínas de ambas especies (Hajishengallis & Lamont 2016). En las muestras de nuestros pacientes, *Streptococcus gordonii* también disminuyó de modo significativo a lo largo de los periodos experimentales estudiados. Ambos microorganismos comensales, *Veillonella parvula* y *Streptococcus gordonii*, pertenecientes al filo Bacillota, disminuyeron significativamente en el conjunto de nuestras muestras.

En el anteriormente relatado estudio de Lu y colaboradores, en el seguimiento de la evolución del microbioma asociado a la mucositis periimplantaria, en cuanto a géneros, en su población, *Klebsiella* y *Yersinia* mostraron fuertes

correlaciones negativas con los géneros patógenos *Porphyromonas*, *Tannerella* y *Treponema*. Por otra parte, los géneros comensales, incluidos *Actinomyces* y *Streptococcus* disminuían desde el tiempo inicial hasta los dos años, mostrándose como antagónicos del desarrollo de géneros patógenos en la comunidad submucosa. La presencia inicial de géneros como *Pseudomonas*, *Bacteroidetes*, *Peptostreptococcaceae*, *Veillonellaceae* o *TM7* se correlacionó positivamente con la expresión de *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Treponema* y *Prevotella* después de dos años, por lo que su presencia inicial debe ser tenida en cuenta como un factor de riesgo. Es importante destacar que la riqueza microbiana medida a través del índice Chao1 no mostró diferencias significativas entre los tres tiempos de seguimiento, lo que indica que el número de OTUs no cambió significativamente, pero la diversidad microbiana según el índice Shannon aumentó drásticamente de T1 a T3. Tal y como ocurrió en nuestros pacientes, la microbiota en los puntos temporales diferentes se agrupó de forma distinta, aunque no hubo cambios en la diversidad, lo que sugiere la transición dinámica de la comunidad periimplantaria a lo largo del tiempo (Lu et al. 2021).

Siddiqi y colaboradores analizaron la colonización por tres organismos potencialmente patógenos (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *S. aureus*) de implantes, tanto de titanio como de zirconio, 6 meses tras su implantación en pacientes edéntulos. Emplearon muestras microbiológicas tomadas de la lengua y de surcos periimplantarios que evaluaron mediante técnicas de qRT-PCR. Sus resultados aportaron niveles relativos de las bacterias estudiadas por debajo del límite inferior de cuantificación en todas las muestras analizadas (muestras linguales y periimplantarias), con lo que concluyeron que claramente los organismos analizados no emergieron a niveles detectables 6 meses después de la colocación de los implantes, independientemente del tipo de material de implante utilizado (Siddiqi et al. 2016). Aunque sus resultados son consecuentes con otros estudios, que también son incapaces de detectar dichas

bacterias en pacientes completamente desdentados (Kocar et al. 2010), entendemos que esto se pueda deber a la sensibilidad de las técnicas de detección microbiológica empleadas. Devides y Franco tampoco detectaron la presencia de *Porphyromonas gingivalis* en pacientes edéntulos antes de la colocación del implante, pero, sin embargo, esta bacteria estaba presente en el 46,7% y 53,3% de los pacientes tras los 4 y 6 meses de la colocación de sus implantes, respectivamente, describiendo que la colonización bacteriana de los surcos periimplantarios es dependiente tanto del tiempo como del ecosistema oral (Devides & Franco 2006). En nuestro estudio, *Porphyromonas gingivalis* es detectable en todos los tiempos, pero como se ha descrito aumenta drásticamente en el tiempo 60 meses.

Las nuevas tecnologías de detección microbiológica arrojan datos, en ocasiones, muy diferentes. En uno de los primeros estudios en los que se utilizó la tecnología de pirosecuenciación, Kumar y colaboradores demostraron que géneros como *Aerofilium*, *Anaerococcus*, *Anaerovorax*, *Burkholderia* y *Exiguobacterium* parecían estar asociados exclusivamente al nicho periimplantario. El microbioma periimplantario estaba compuesto principalmente por los géneros *Actinomyces*, *Butyrivibrio*, *Campylobacter*, *Eubacterium*, *Lactococcus*, *Leptotrichia*, *Peptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Streptococcus* y *Treponema*. Las lesiones periimplantarias se asociaron a niveles más bajos de *Leptotrichia* y *Prevotella*, pero más altos de *Actinomyces*, *Butyrivibrio*, *Campylobacter*, *Peptococcus*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus non mutans* que los implantes sanos (Kumar et al. 2012). En nuestro caso, el microbioma de nuestros implantes, con una baja incidencia con periimplantitis, los géneros más habituales fueron inicialmente *Prevotella*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Veillonella*, *Capnocytophaga*, *Rothia*, *Selenomonas*, *Leptotrichia*, *Campylobacter*, *Moraxella*, *Aggregatibacter*, *Tannerella*, *Corynebacterium*, *Parvimonas*, *Schaalia*, *Filifactor*,

*Porphyromonas*, *Lautropia*, *Gemella*, *Chryseobacterium*, *Klebsiella*, *Bacteroides*, *Eikenella*, *Cutibacterium* y *Staphylococcus*, con una evolución cambiante en el tiempo aunque sin significación estadística para el aumento de las bacterias periodontopatógenas. De hecho, sólo aumentó significativamente *Corynebacterium* entre 3 y 60 meses ( $p=0,024$ ), y disminuyeron significativamente *Veillonella* (3 a 60 meses;  $p=0,031$ ), *Selenomonas* (3 y 60 meses;  $p=0,037$ ), *Leptotrichia* (3 y 60 meses;  $p=0,027$ ), *Moraxella* (1 y 60 meses;  $p=0,001$ , entre 3 y 60 meses;  $p=0,007$ , entre 12 y 60 meses;  $p=0,001$ ), *Schaalia* (entre 1 y 60 meses;  $p=0,001$  y entre 3 y 60 meses;  $p=0,033$ ), *Chryseobacterium* (1 y 60 meses;  $p=0,018$ ), *Klebsiella* (entre 3 y 60 meses;  $p=0,001$  y entre 12 y 60 meses;  $p<0,001$ ), *Cutibacterium* (entre 1 y 60 meses;  $p=0,006$ , entre 3 y 60 meses;  $p=0,003$  y entre 12 y 60 meses;  $p<0,001$ ) y *Staphylococcus* (entre 12 y 60 meses;  $p<0,001$ ), bacterias en su mayoría no asociadas tradicionalmente a patología periimplantaria.

Es de interés entender cómo ocurre la colonización microbiológica alrededor de los implantes una vez que estos son expuestos al medio oral y cómo dicho ecosistema puede influir en la progresión de dicha colonización. De hecho, como se ha venido relatando, se entiende que la colonización microbiológica del surco está marcada por el ecosistema preexistente en los pacientes. En este sentido, la periodoncia moderna, desde hace años, apoya sin fisuras el hecho de que los pacientes periodontales son más proclives a desarrollar periimplantitis que los pacientes sanos (Lindhe & Meyle 2008). Sin embargo, los nuevos datos clínicos de estudios de seguimiento a largo plazo ponen en duda dicha premisa (Cecchinato et al. 2017; Galindo-Moreno et al. 2023). El principal baluarte científico que avala la teoría de que los pacientes periodontales están más predispuestos a padecer periimplantitis es la similitud entre las bacterias patogénicas en ambos ambientes. Sin embargo, no podemos olvidar varios hechos, como que en mayor probabilidad los implantes dentales se colocan en pacientes que pierden más cantidad de dientes y estos son, por

prevalencia, sin duda, los pacientes periodontales. Tampoco podemos olvidar el hecho de que ambas patologías, periodontitis y periimplantitis, cursan con características clínicas comunes, entre las que se incluye la destrucción del tejido alveolar de soporte y, por lo tanto, es normal pensar que el mismo evento biológico esté producido por los mismos mecanismos etiopatogénicos. En consecuencia, es también lógico asumir que el microbioma asociado a ambas entidades etiológicas deba ser común, aunque exhiban diferencias ciertas. En general, los datos disponibles sobre la composición del microbioma subgingival asociado a lesiones de periimplantitis indican niveles elevados de las más comunes especies bacterianas previamente asociadas a la periodontitis, pero también se han detectado otros microorganismos no implicados como patógenos periodontales en muestras de lesiones periimplantarias como, por ejemplo, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloace*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus micra*, *Pseudomonas spp.*, *Candida spp.*, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis* (Faveri et al. 2015). Además, es importante remarcar que el microbioma periodontal tiene una diversidad significativamente mayor que el del implante, con linajes bacterianos distintos en la salud y la enfermedad en cada ecosistema, ya sea diente o implante (Dabdoub et al. 2013).

Sin embargo, existen otras condiciones clínicas en las que la colonización microbiológica del surco periimplantario y en su evolución hay factores que deben ser evaluados. Uno de ellos es como es la relación microbiológica entre los dientes sanos contiguos o antagonistas del paciente y los implantes situados tan solo a unos milímetros. En este sentido, Dabdoud y colaboradores, indicaron que el 60% de los individuos comparten menos del 50% de todas las especies entre su microbioma periodontal y periimplantario, y que además el 85% de los individuos comparten menos del 8% de las especies abundantes entre sus dientes y los implantes que llevan, remarcando que la simple proximidad geográfica no es factor suficientemente determinante para la

colonización de nichos topográficamente distintos. Según estos autores, los microbiomas periimplantario y periodontal representan ecosistemas microbiológicamente distintos (Dabdoub et al. 2013). En nuestro caso, por el momento para esta Tesis Doctoral, no hemos realizado el análisis del microbioma de proximidad con el diente vecino. Otro factor de proximidad a tener en cuenta en la colonización microbiológica de los nuevos surcos periimplantarios es la relación del microbioma de implantes sanos y enfermos del mismo paciente, que se encuentran en clara proximidad geográfica y como dicho microbioma evolucionaría desde implantes sanos a implantes con diverso grado de patología. Para el análisis de esta relación, Song y colaboradores diseñaron un estudio transversal por pares para comparar las características del microbioma y las citocinas proinflamatorias provenientes de implantes sanos o con periimplantitis en los mismos individuos, analizando un total de 44 muestras de 22 pacientes. En su población, el filo Proteobacteria, así como los géneros *Neisseria*, *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Rothia* representaron la mayor parte del microbioma submucoso en las zonas de implantes sanos, mientras que los filos Bacteroidetes, Spirochaetes y Synergistetes, así como los géneros *Porphyromonas*, *Treponema*, *Filifactor*, *Fretibacterium*, *Lachnospiraceae G-8* y *Peptostreptococcaceae XIG-1* fueron más abundantes en las zonas de periimplantitis. Cuando se valoró la riqueza de ambos microbiomas, expresada con el índice Chao1, no hubo diferencias significativas entre implantes sanos y enfermos, pero cuando se evaluó la diversidad microbiana, expresada por el índice Simpson, ésta fue significativamente mayor en las zonas afectadas por periimplantitis. Estos autores también demostraron que la diferencia intergrupos era significativamente mayor que la diferencia intragrupos, lo que confirmaba la microbiota diferencial entre implantes sanos e implantes con periimplantitis (Song et al. 2022). En un estudio similar, Jung y Lee, comparando el microbioma de implantes sanos y enfermos de los mismos pacientes, reportaron un aumento en la composición de Bacteroidetes en el surco

periimplantario de aquellos implantes con periimplantitis en relación al grupo de implantes sanos. En consecuencia, la composición de Proteobacterias disminuyó en el mismo sentido, mostrando una menor cantidad en el grupo de implantes con patología. Los implantes sanos mostraron principalmente Firmicutes (45,2%) y Proteobacterias, mientras que los implantes con periimplantitis mostraron Firmicutes (32,5%) seguidos de Bacteroidetes (27,9%). A nivel de género, la composición de *Streptococcus* disminuyó en el grupo con periimplantitis, mientras que *Porphyromonas* aumentó en ese grupo para todos los sujetos. A este nivel, el microbioma de los implantes sanos estaba compuesto principalmente por *Streptococcus* (21,2%), mientras que el microbioma de los implantes enfermos sólo estaba compuesto por *Streptococcus* en un 7,9%. En el mismo sentido, el 4,9% del grupo sano era del género *Neisseria*, mientras que sólo el 1,0% del grupo enfermo era del género *Neisseria*. Por el contrario, el microbioma de los implantes con patología estaba compuesto principalmente por *Porphyromonas* (13,2%), en particular *Porphyromonas gingivalis* (10,4%) (Jung & Lee 2023). Estos cambios parecen pertinentes, ya que el microbioma de las zonas periimplantarias sanas está formado principalmente por cocos Gram positivos, bacilos no móviles y unas pocas especies anaerobias Gram negativas (Mombelli et al. 1987). Conforme aumenta la inflamación de los tejidos blandos, la bolsa periimplantaria se incrementa, conduciendo a la promoción de un ambiente más anaerobio, con predominancia por especies Gram negativas, de pigmentación negra, móviles y anaerobias, típicas de las bolsas periodontales profundas (Mombelli & Décaillot 2011), donde el llamado grupo del complejo rojo (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) suele predominar en las zonas de periimplantitis, con mayor abundancia que las zonas sanas. Por lo tanto, los datos reportados por Jung and Lee indican que el cambio del perfil bacteriano del grupo sano al grupo con patología periimplantaria de su estudio respalda esta evolución. Así, los autores sugirieron que la composición microbiológica del surco periimplantario no sólo difiere mucho de un

individuo a otro, sino también que estas variaciones estaban presentes entre los implantes sanos y los implantes con periimplantitis, lo que sugiere que las diferencias en la composición bacteriana del surco periimplantario sano y del surco periimplantario patológico se deben a cambios locales que promueven una adaptación del microbioma a las nuevas condiciones ambientales (anaerobios frente a aerobios), y no tanto a diferencias en el huésped (Jung & Lee 2023). Si bien esta información es muy relevante, el presente trabajo no puede refrendar estos datos ya que en nuestra muestra no había implantes enfermos a priori, y solo podríamos discutir los cambios sufridos en 4 pacientes que han evolucionado a periimplantitis, pero cuyo microbioma no ha seguido un patrón evolutivo similar al periodontal, ya que como describimos en el apartado correspondiente, el microbioma de estos implantes no contenía las especies bacterianas típicas de la enfermedad periodontal, específicamente las bacterias del complejo rojo. Por el contrario, los pacientes que mostraron una abundancia relativa mayor de *Porphyromonas gingivalis* en el seguimiento a 60 meses mantuvieron su tejido periimplantario en un estado absoluto de salud.

Por otra parte, es importante remarcar que el microbioma también puede estar influenciado por el entorno en el que se desarrolla, y así las características del material de restauración o del titanio del implante *per se* puede jugar un papel importante tanto en su evolución como en su comportamiento. En este sentido, la rugosidad de la superficie y la energía libre de la superficie son factores determinantes en la adhesión del biofilm sobre la superficie de los implantes y, por tanto, condicionan la composición del microbioma en el surco periimplantario (Quirynen et al. 1993). Distintos estudios *in vitro* establecen que muchas bacterias, como *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* o *Lactobacillus salivarius* se pueden adherir de modo mucho más eficaz al titanio rugoso, sea cual sea la modificación que se realice en dichas superficies para conseguir tal rugosidad (Amoroso et al. 2006; Badihi Hauslich

et al. 2013). En un estudio en humanos, Sinjab y colaboradores encontraron que los implantes sanos de superficie anodizada (AN), recubiertos de hidroxiapatita (HA) o grabados al ácido con chorro de arena (SLA), no mostraron diferencias significativas en cuanto a agrupación y diversidad alfa o beta del microbioma periimplantario en función de la modificación de la superficie pero, sin embargo, las superficies anodizadas y recubiertas de hidroxiapatita sí mostraban diferencias significativas entre la salud y la periimplantitis, no solamente en la composición del microbioma sino también en la magnitud y diversidad del mismo. Esto no ocurría en las superficies tipo SLA, sugiriendo que la superficie del implante modifica de forma diferencial el microbioma asociado a la enfermedad, lo que posiciona la topografía de la superficie como un factor más en la etiología multifactorial de las enfermedades periimplantarias. Por ejemplo, en implantes anodizados con patología periimplantaria se identificaron 14 especies diferencialmente abundantes en comparación con los implantes sanos, incluyendo *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* spp., *Capnocytophaga sputigena*, *Treponema* sp., *Johnsonella ignava*, *Leptotrichia hongkongensis*, *Eubacterium* spp., y *Corynebacterium durum*. En implantes con patología recubiertos de hidroxiapatita se encontraron niveles más altos en 24 especies en relación a implantes sanos con esa topografía, incluyendo *Prevotella* spp., *Eubacterium* spp., *Desulfolobus* sp., *Streptococcus constellatus*, *Porphyromonas* sp., *Cardiobacterium valvarum*, *Peptidophaga gingivicola*, *Lautropiamirabilis*, *Bulledia extruxta*, *Shuttleworthia satelles*, *Anaeroglobulus geminatus* y *Fretibacterium fastidiosum* y, a su vez, una menor abundancia de *Veillonella atypica* en comparación con implantes sanos. Finalmente, los implantes recubiertos con SLA con patología mostraban menor abundancia de *Prevotella histicola* y *Peptoniphilaceae bacterium HMT790*, pero niveles más elevados de *Anaeroloneae bacterium HMT439* y *Capnocytophaga* sp. (Sinjab et al. 2023).

En este sentido se expresan otro tipo de trabajos clínicos, que afirman claramente que el tratamiento quirúrgico y antibacteriano con antibióticos y antisépticos de la periimplantitis mostraba resultados diferentes en función de las características de la superficie del implante, de modo que los implantes con superficies no modificadas mostraban una mejor respuesta en términos de variables clínicas, aunque no microbiológicas. Los autores indicaron que el beneficio de estas terapias de mantenimiento no puede mantenerse a lo largo del tiempo, a pesar de un mantenimiento muy cuidadoso (Carcuac et al. 2017). En este sentido, Costa y colaboradores, en un estudio de seguimiento del microbioma de implantes con mucositis periimplantaria a 5 años, comparando un grupo de implantes con mantenimiento en comparación a un grupo sin mantenimiento, demostraron que aquellos implantes sin tratamiento progresaron más rápidamente a periimplantitis, mostrando una carga bacteriana total significativamente superior y una mayor frecuencia principalmente de *P. gingivalis*, *T. denticola* y *F. nucleatum* (Costa et al. 2019).

Analizando estudios de seguimiento del microbioma en el surco periimplantario de implantes sanos en base al material expuesto al medio, de Oliveria Silva y colaboradores llevaron a cabo un estudio de seguimiento de perfil microbiológico supra y subgingival de implantes unitarios rehabilitados con aditamentos de zirconio o de titanio, durante 3 años de seguimiento. Un total de 744 muestras relacionadas con el implante y los dientes contralaterales se evaluaron durante todo el estudio. Los autores no reportaron infección local, inflamación, fístula ni mucositis periimplantaria en ningún caso. La pérdida ósea marginal media alrededor de los implantes dentales después de 3 años fue de  $0,99 \pm 0,41$  mm para los implantes restaurados con aditamentos de titanio y  $0,76 \pm 0,21$  mm para los implantes rehabilitados con zirconio (de Oliveira Silva et al. 2020). Los autores no reportaron diferencias significativas en los valores de pérdida ósea marginal, intragrupo e intergrupo, durante todo el estudio. Los

cambios medios a lo largo del tiempo para los grupos de titanio y de óxido de zirconio, fueron:  $-0,39 \pm 0,64$  mm (Ti) y  $-0,30 \pm 0,22$  mm (Zr) (desde la carga hasta 1 año),  $-0,26 \pm 0,32$  mm (Ti) y  $-0,34 \pm 0,33$  mm (Zr) (1-2 años),  $-0,34 \pm 0,26$  mm (Ti) y  $-0,12 \pm 0,07$  mm (Zr) (2-3 años). Sin embargo, la profundidad de sondaje en los implantes rehabilitados con titanio aumentó significativamente durante el primer año de carga ( $p < 0,05$ ), mientras que permaneció inalterada para las restauraciones de zirconio. El sangrado al sondaje aumentó con el tiempo en ambos materiales investigados ( $p < 0,05$ ) sin relación estadística entre el sangrado al sondaje y la profundidad de sondaje (de Freitas et al. 2021). Los datos microbiológicos de este análisis, publicados en dos manuscritos diferentes, confirmaron que, como era de esperar, los recuentos microbiológicos de las muestras subgingivales y supragingivales fueron significativamente inferiores al inicio (T0) en cada uno de los grupos. Por lo tanto, se encontraron diferencias significativas al comparar los recuentos de genomas microbianos de los distintos lugares y sustratos después de 3 años en función ( $p < 0,0001$ ). En este estudio, el tipo de material restaurador influyó en la cantidad total de microorganismos adheridos a dichas superficies. Las muestras subgingivales del grupo de titanio presentaron los mayores recuentos de microbioma al inicio y al cabo de 1 año de seguimiento. Por el contrario, las muestras subgingivales de zirconio presentaron los recuentos más elevados en los siguientes 2 y 3 años. En general, la microbiota de implantes restaurados con pilares de titanio o zirconio se mostró muy similar a la encontrada en los dientes restantes. La menor diversidad microbiana en las muestras subgingivales se observó obviamente al inicio del estudio (T0). De las 37 especies que los autores tenían como objeto analizar, al inicio del estudio, sólo cinco colonizaban los surcos periimplantarios de implantes rehabilitados con aditamentos de titanio (*Treponema denticola*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sobrinus* y *Veillonella parvula*) o con zirconio (*Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mitis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotipo a*, *Veillonella parvula* y *Peptostreptococcus*

*anaerobius*). Sin embargo, tras un año de carga, la diversidad microbiológica fue mayor y todas las especies investigadas colonizaron las biopelículas. No obstante, las especies detectadas fueron siendo encontradas en mayor cantidad conforme evolucionaron los puntos de análisis durante los años. En cualquier caso, se detectaron especies no patógenas y patógenas en los distintos lugares investigados. Así, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotipo a* y *Fusobacterium nucleatum* fueron las especies con los recuentos genómicos más elevados en las muestras subgingivales de implantes rehabilitados con aditamento de titanio, de zirconio, así como en los dientes contralaterales, mientras que *Streptococcus sanguinis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotipo a* fueron las especies más abundantes en la biopelícula supragingival de titanio y zirconio. Las proporciones de especies patógenas comúnmente relacionadas con la etiología de la periodontitis y la periimplantitis se agruparon en los cinco complejos microbianos basándose en la descripción de Socransky y colaboradores (Haffajee et al. 2008). Por último, cabe mencionar que se produjeron algunas variaciones con respecto al microbioma basal, variando la distribución de los complejos amarillo y verde, con un llamativo aumento del complejo rojo en las muestras subgingivales. En general, se registraron porcentajes bajos de microorganismos pertenecientes a los complejos rojo y naranja a lo largo del tiempo (8%-14%). Las especies representativas del grupo "otras especies", que incluían microorganismos no patógenos, fueron las más prevalentes durante todo el periodo de seguimiento, representando aproximadamente el 50% de las especies detectadas (de Oliveira Silva et al. 2020). Por otra parte, en cuanto a las correlaciones clínicas, el género *Tannerella* se correlacionó estadísticamente con el sangrado al sondaje en el grupo de titanio y con la profundidad de sondaje en el grupo de óxido de zirconio mientras que el género *Treponema* lo hizo con el sangrado al sondaje en el grupo de óxido de zirconio y el género *Porphyromonas* con la pérdida ósea en el grupo de óxido de zirconio (de Freitas et al. 2021). En esta Tesis Doctoral, con un seguimiento temporal mayor, solo se evaluaron implantes

restaurados con prótesis sobre pilares de titanio de diversa altura, y no hemos podido encontrar un patrón claro de evolución del microbioma a lo largo del tiempo. Como cabría esperar, en nuestros pacientes se produce un cambio desde la disminución de los filos Proteobacteria y Actinobacteria hacia el aumento de los filos Bacteroidetes, Firmicutes y Spirochaetes, con una mayor abundancia relativa de especies bacterianas periodontopatógenas, especialmente *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*. Sin embargo, estos cambios no son significativos puesto que dichas especies están aumentadas en un número muy limitado de nuestros pacientes y, por tanto, con una desviación estándar altísima. Sin embargo, sí podemos afirmar una evolución en el tiempo, en el sentido del aumento generalizado de otras especies, como son *Fusobacterium nucleatum* y *Streptococcus mitis*, que, si bien en el caso del primero se ha relacionado mucho con la enfermedad periodontal y periimplantaria, principalmente por su papel de colaboración disbiótica con *Porphyromonas gingivalis*, es una especie que muestra una altísima abundancia relativa en pacientes sanos, tanto en dientes como en implantes. De hecho, en nuestra población, fue la segunda especie de mayor abundancia relativa en el primer punto de estudio.

Nuestro protocolo de estudio fue diseñado para enmarcarse en el rango de carga temprana, teniendo en cuenta algunos factores importantes. El primero de ellos, puesto que el objetivo fundamental era el de valorar la capacidad de la superficie para recibir carga a 4 semanas y valorar su comportamiento posterior, el protocolo de fresado no se vio modificado por la disponibilidad ósea ni se tuvo en cuenta la retención mecánica ofrecida por la estabilidad primaria de inserción, como sí lo es en protocolos de carga inmediata o de carga muy temprana. De hecho, algunos de los estudios mencionados anteriormente emplearon estos datos como criterio de inclusión o exclusión (Salvi et al. 2004; Grandi et al. 2015; Mitsias et al. 2018). Por tanto, a la vista de nuestros resultados, podemos intuir que más importante que dichas

características del hueso o del protocolo de fresado es la propia superficie del implante. Por este motivo, a pesar de que aún hoy sometemos a nuestros pacientes a largos tiempos de espera, debemos ser más conscientes del proceso biológico de la osteointegración, así como su temporalidad y modificar nuestros protocolos clínicos consecuentemente.

Este trabajo de Tesis Doctoral ha tenido sus limitaciones. La principal limitación del estudio es el tamaño de la muestra, particularmente importante para realizar comparaciones dentro de los grupos de la influencia de otras variables sobre la principal variable del estudio, la pérdida marginal ósea. A pesar de esto, se hizo un análisis de potencia estadística previo al diseño del estudio, siendo el tamaño muestral seleccionado el indicado por dicho análisis de potencia. Eso sí, para dicho cálculo se empleó como base la variable principal de análisis, es decir, la comparación entre grupo de tiempos de carga respecto a los niveles de pérdida ósea marginal. Del mismo modo, un estudio de seguimiento a 5 años sufre, indudablemente y con mucha facilidad pérdida de seguimiento de algunos pacientes, ya que, a pesar de nuestra insistencia, los pacientes gozan del derecho de asistir o no a sus visitas de seguimiento o de discontinuar su participación en el estudio. Esto ha motivado que en algunos de los tiempos de seguimiento la muestra no haya mantenido la uniformidad deseada por todo investigador.



# ***CONCLUSIONES***



## 8. CONCLUSIONES

Dentro de las limitaciones mencionadas, atendiendo a los objetivos e hipótesis inicialmente planteadas se puede concluir que:

1. El éxito clínico y radiológico hasta 5 años tras la carga protésica de implantes modificados en superficie con multifosfonato sometidos a carga temprana es similar al obtenido con implantes del mismo tipo sometidos a carga convencional.
2. Los cambios de nivel de hueso marginal alrededor de los implantes cargados de forma temprana o convencional son equivalentes hasta 5 años tras la carga. Estos niveles pueden considerarse óptimos, estando en todos los casos en el entorno de los 0,2 a 0,3 mm por debajo del hombro del implante en el seguimiento a 5 años.
3. Ninguno de los diversos factores clínicos dependientes del sitio o del paciente tuvieron influencia significativa en el nivel de hueso marginal alrededor de los implantes cargados de forma temprana o convencional.
4. El perfil microbiológico alrededor de los implantes tratados con multifosfonato después de ser cargados de manera temprana o convencional muestra similitudes entre sí, no habiendo diferencias significativas según el momento de la carga. Las diferencias detectadas fueron principalmente en la comparación entre los datos al inicio de la maduración del surco periimplantario (3 meses) y el seguimiento a largo plazo (5 años).



# ***BIBLIOGRAFÍA***



## 9. BIBLIOGRAFÍA

Afrashtehfar, K.I., Weber, A. & Abou-Ayash, S. (2022) Titanium-base abutments may have similar long-term peri-implant effects as non-bonded one-piece abutments. *Evidence-Based Dentistry* **23**: 134–135.

Albrektsson, T. & Isidor, F. (1994) Consensus Report of Session IV. In: *Proceedings of the First European Workshop on Periodontology*. (Eds N.P. Lang & T. Karring), pp. 365–369. Quintessence Publishing Co, Inc., London.

Albrektsson, T., Tengvall, P., Amengual, L., Coli, P., Kotsakis, G.A. & Cochran, D. (2022) Osteoimmune regulation underlies oral implant osseointegration and its perturbation. *Frontiers in Immunology* **13**: 1056914.

Albrektsson, T. & Wennerberg, A. (2004a) Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *The International Journal of Prosthodontics* **17**: 536–543.

Albrektsson, T. & Wennerberg, A. (2004b) Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *The International Journal of Prosthodontics* **17**: 544–564.

Albrektsson, T., Zarb, G., Worthington, P. & Eriksson, A.R. (1986) The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **1**: 11–25.

Amoroso, P.F., Adams, R.J., Waters, M.G.J. & Williams, D.W. (2006) Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 633–637.

Arghami, A., Simmons, D., St Germain, J. & Maney, P. (2021) Immediate and early loading of hydrothermally treated, hydroxyapatite-coated dental implants: a 7-year prospective randomized clinical study. *International Journal of Implant Dentistry* **7**: 21.

Badihi Hauslich, L., Sela, M.N., Steinberg, D., Rosen, G. & Kohavi, D. (2013) The adhesion of oral bacteria to modified titanium surfaces: role of plasma proteins and electrostatic forces. *Clinical Oral Implants Research* **24 Suppl A100**: 49–56.

Barbagallo, G., Santagati, M., Guni, A., Torrisi, P., Spitale, A., Stefani, S., Ferlito, S. & Nibali, L. (2022) Microbiome differences in periodontal, peri-implant, and healthy sites: a cross-sectional pilot study. *Clinical Oral Investigations* **26**: 2771–2781.

- Belibasakis, G.N. & Manoil, D. (2021) Microbial community-driven etiopathogenesis of peri-Implantitis. *Journal of Dental Research* **100**: 21–28.
- Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P. & Lindhe, J. (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 251–262.
- Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M.G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P.M., Chen, S., Cochran, D., Derks, J., Figuero, E., Hämmerle, C.H.F., Heitz-Mayfield, L.J.A., Huynh-Ba, G., Iacono, V., Koo, K.T., Lambert, F., McCauley, L., Quirynen, M., Renvert, S., Salvi, G.E., Schwarz, F., Tarnow, D., Tomasi, C., Wang, H.L. & Zitzmann, N. (2018) Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology* **89**: S313–S318.
- Bilhan, H., Mumcu, E. & Arat, S. (2010) The role of timing of loading on later marginal bone loss around dental implants: a retrospective clinical study. *Journal of Oral Implantology* **36**: 363–376.
- Bor, B., Bedree, J.K., Shi, W., McLean, J.S. & He, X. (2019) Saccharibacteria (TM7) in the human oral microbiome. *Journal of Dental Research* **98**: 500–509.
- Borges, T., Almeida, B.L. & Pereira, M. (2019) Periimplant bone changes in different abutment heights and insertion timing - three-year results from a randomized prospective clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* **30**: 37–37.
- Borges, T., Leitão, B., Pereira, M., Carvalho, Á. & Galindo-Moreno, P. (2018) Influence of the abutment height and connection timing in early peri-implant marginal bone changes: A prospective randomized clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* **29**: 907–914.
- Bornstein, M.M., Wittneben, J.-G., Brägger, U. & Buser, D. (2010) Early loading at 21 days of non-submerged titanium implants with a chemically modified sandblasted and acid-etched surface: 3-year results of a prospective study in the posterior mandible. *Journal of Periodontology* **81**: 809–818.
- Branemark, P.I. (1959) Vital microscopy of bone marrow in rabbit. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **11 Supp 38**: 1–82.
- Cannizzaro, G., Felice, P., Leone, M., Ferri, V., Viola, P. & Esposito, M. (2012) Immediate versus early loading of 6.5 mm-long flapless-placed single implants: a 4-year after loading report of a split-mouth randomised controlled trial. *European Journal of Oral Implantology* **5**: 111–121.
- Cannizzaro, G., Felice, P., Trullenque-Eriksson, A., Lazzarini, M., Velasco-Ortega, E. & Esposito, M. (2018) Immediate vs early loading of 6.6 mm

flapless-placed single implants: 9 years after-loading report of a split-mouth randomised controlled trial. *European Journal of Oral Implantology* **11**: 163–173.

Cannizzaro, G., Leone, M., Torchio, C., Viola, P. & Esposito, M. (2008) Immediate versus early loading of 7-mm-long flapless-placed single implants: a split-mouth randomised controlled clinical trial. *European Journal of Oral Implantology* **1**: 277–292.

Carcuac, O., Derks, J., Abrahamsson, I., Wennström, J.L., Petzold, M. & Berglundh, T. (2017) Surgical treatment of peri-implantitis: 3-year results from a randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **44**: 1294–1303.

Cecchinato, D., Marino, M. & Lindhe, J. (2017) Bone loss at implants and teeth in the same segment of the dentition in partially dentate subjects. *Clinical Oral Implants Research* **28**: 626–630.

Charalampakis, G. & Belibasakis, G.N. (2015) Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence* **6**: 183–187.

Cirera, A., Sevilla, P., Manzanares, M.C., Franch, J., Galindo-Moreno, P. & Gil, J. (2020) Osseointegration around dental implants biofunctionalized with TGFβ-1 inhibitor peptides: an in vivo study in beagle dogs. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **31**: 62.

Cooper, L.F., Ellner, S., Moriarty, J., Felton, D.A., Paquette, D., Molina, A., Chaffee, N., Asplund, P., Smith, R. & Hostner, C. (2007) Three-year evaluation of single-tooth implants restored 3 weeks after 1-stage surgery. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **22**: 791–800.

Cortelli, S.C., Cortelli, J.R., Romeiro, R.L., Costa, F.O., Aquino, D.R., Orzechowski, P.R., Araújo, V.C. & Duarte, P.M. (2013) Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. *Archives of Oral Biology* **58**: 67–74.

Costa, F.O., Ferreira, S.D., Cortelli, J.R., Lima, R.P.E., Cortelli, S.C. & Cota, L.O.M. (2019) Microbiological profile associated with peri-implant diseases in individuals with and without preventive maintenance therapy: a 5-year follow-up. *Clinical Oral Investigations* **23**: 3161–3171.

Dabdoub, S.M., Tsigarida, A.A. & Kumar, P.S. (2013) Patient-specific analysis of periodontal and peri-implant microbiomes. *Journal of Dental Research* **92**: 168S–75S.

Davies, J.E. (2007) Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials* **28**: 5058–5067.

Davies, J.E. (2003) Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal*

---

*of Dental Education* **67**: 932–949.

Devides, S.L. & Franco, A.T. de M. (2006) Evaluation of peri-implant microbiota using the polymerase chain reaction in completely edentulous patients before and after placement of implant-supported prostheses submitted to immediate load. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **21**: 262–269.

Duyck, J., Corpas, L., Vermeiren, S., Ogawa, T., Quirynen, M., Vandamme, K., Jacobs, R. & Naert, I. (2010) Histological, histomorphometrical, and radiological evaluation of an experimental implant design with a high insertion torque. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 877–884.

Ellingsen, J.E., Johansson, C.B., Wennerberg, A. & Holmén, A. (2004) Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **19**: 659–666.

Esposito, M., Dojcinovic, I., Germon, L., Lévy, N., Curno, R., Buchini, S., Péchy, P. & Aronsson, B.-O. (2013) Safety and efficacy of a biomimetic monolayer of permanently bound multi-phosphonic acid molecules on dental implants: 1 year post-loading results from a pilot quadruple-blinded randomised controlled trial. *European Journal of Oral Implantology* **6**: 227–236.

Faveri, M., Figueiredo, L.C., Shibli, J.A., Pérez-Chaparro, P.J. & Feres, M. (2015) Microbiological diversity of peri-implantitis biofilms. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **830**: 85–96.

de Freitas, A.R., Del Rey, Y.C., de Souza Santos, E., Faria Ribeiro, R., de Albuquerque Junior, R.F. & do Nascimento, C. (2021) Microbial communities of titanium versus zirconia abutments on implant-supported restorations: Biodiversity composition and its impact on clinical parameters over a 3-year longitudinal prospective study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **23**: 197–207.

Galindo-Moreno, P., Catena, A., Lopez-Chaichio, L., Borges, T., O'Valle, F., Torrecillas-Martínez, L. & Padial-Molina, M. (2023) The influence of history of severe periodontitis on estimated long-term marginal bone loss around implants restored with fixed segmented full-arch rehabilitation. *Journal of Clinical Medicine* **12**: 6665.

Galindo-Moreno, P., Catena, A., Pérez-Sayáns, M., Fernández-Barbero, J.E., O'Valle, F. & Padial-Molina, M. (2022a) Early marginal bone loss around dental implants to define success in implant dentistry: A retrospective study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **24**: 630–642.

Galindo-Moreno, P., León-Cano, A., Ortega-Oller, I., Monje, A., O'valle, F. & Catena, A. (2015) Marginal bone loss as success criterion in implant

dentistry: Beyond 2 mm. *Clinical Oral Implants Research* **26**: e28–e34.

Galindo-Moreno, P., León-Cano, A., Ortega-Oller, I., Monje, A., Suárez, F., ÓValle, F., Spinato, S. & Catena, A. (2014) Prosthetic abutment height is a key factor in peri-implant marginal bone loss. *Journal of Dental Research* **93**: 80S–85S.

Galindo-Moreno, P., Nilsson, P., King, P., Becktor, J., Speroni, S., Schramm, A. & Maiorana, C. (2012) Clinical and radiographic evaluation of early loaded narrow diameter implants - 1-year follow-up. *Clinical Oral Implants Research* **23**: 609–616.

Galindo-Moreno, P., Nilsson, P., King, P., Worsaae, N., Schramm, A., Padiál-Molina, M. & Maiorana, C. (2017) Clinical and radiographic evaluation of early loaded narrow-diameter implants: 5-year follow-up of a multicenter prospective clinical study. *Clinical Oral Implants Research* **28**: 1584–1591.

Galindo-Moreno, P., Ravidà, A., Catena, A., O'Valle, F., Padiál-Molina, M. & Wang, H.-L. (2022b) Limited marginal bone loss in implant-supported fixed full-arch rehabilitations after 5 years of follow-up. *Clinical Oral Implants Research* **33**: 1224–1232.

Gallucci, G.O., Hamilton, A., Zhou, W., Buser, D. & Chen, S. (2018) Implant placement and loading protocols in partially edentulous patients: A systematic review. *Clinical Oral Implants Research* **29 Suppl 16**: 106–134.

Ghimire, S., Miramini, S., Richardson, M., Mendis, P. & Zhang, L. (2018) Role of dynamic loading on early stage of bone fracture healing. *Annals of Biomedical Engineering* **46**: 1768–1784.

González-García, R. & Monje, F. (2013) The reliability of cone-beam computed tomography to assess bone density at dental implant recipient sites: a histomorphometric analysis by micro-CT. *Clinical Oral Implants Research* **24**: 871–879.

Grandi, T., Guazzi, P., Samarani, R., Tohme, H., Khoury, S., Sbricoli, L., Grandi, G. & Esposito, M. (2015) Immediate, early (3 weeks) and conventional loading (4 months) of single implants: Preliminary data at 1 year after loading from a pragmatic multicenter randomised controlled trial. *European Journal of Oral Implantology* **8**: 115–126.

Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Patel, M.R. & Song, X. (2008) Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral microbiology and immunology* **23**: 196–205.

Hajishengallis, G. (2023) Illuminating the oral microbiome and its host interactions: animal models of disease. *FEMS Microbiology Reviews* **47**: fuad018.

Hajishengallis, G. & Lamont, R.J. (2016) Dancing with the stars: how

choreographed bacterial interactions dictate nososymbiocity and give rise to keystone pathogens, accessory pathogens, and pathobionts. *Trends in Microbiology* **24**: 477–489.

Hench, L.L., Splinter, R.J., Allen, W.C. & Greenlee, T.K. (1971) Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research* **5**: 117–141.

Herrera, D., Berglundh, T., Schwarz, F., Chapple, I., Jepsen, S., Sculean, A., Kerschull, M., Papapanou, P.N., Tonetti, M.S., Sanz, M., Aimetti, M., Blanco, J., Bostanci, N., Bouchard, P., Božić, D., Buduneli, N., Calciolari, E., Carra, M.C., Cosgarea, R., Cosyn, J., Dannewitz, B., Danser, M., de Tapia, B., de Waal, Y., Derks, J., Dommisch, H., Donos, N., Eaton, K., Eickholz, P., Kuru, B.E., Figuero, E., Goldstein, M., Graziani, F., Grischke, J., Guerra, F., Heitz-Mayfield, L., Jepsen, K., Kirkevang, L.L., Koldslund, O.C., Lambert, F., Liñares, A., Loos, B., Madianos, P., Matesanz, P., Melo, P., Molina, A., Corti, V.M., Montero, E., Müller, F., Nibali, L., Pascual, A., Polyzois, I., Quirynen, M., Ramanauskaitė, A., Rederiene, G., Renvert, S., Roccuzzo, M., Sahrman, P., Salvi, G., Sánchez, N., Sanz-Sánchez, I., Shapira, L., Stavropoulos, A., Stiesch, M., Tamošiūnaitė, I., Teughels, W., Tomasi, C., Trombelli, L., Vassilopoulos, S., Verket, A., West, N. & Wilensky, A. (2023) Prevention and treatment of peri-implant diseases—The EFP S3 level clinical practice guideline. *Journal of Clinical Periodontology* **50**: 4–76.

Herrero-Climent, M., López-Jarana, P., Lemos, B.F., Gil, F.J., Falcão, C., Ríos-Santos, J.V. & Ríos-Carrasco, B. (2020) Relevant design aspects to improve the stability of titanium dental implants. *Materials (Basel, Switzerland)* **13**: 1910.

Heuer, W., Kettenring, A., Stumpp, S.N., Eberhard, J., Gellermann, E., Winkel, A. & Stiesch, M. (2012) Metagenomic analysis of the peri-implant and periodontal microflora in patients with clinical signs of gingivitis or mucositis. *Clinical Oral Investigations* **16**: 843–850.

Ho, K.-N., Salamanca, E., Lin, H.-K., Lee, S.-Y. & Chang, W.-J. (2016) Marginal bone level evaluation after functional loading around two different dental implant designs. *BioMed Research International* **2016**: e1472090.

Hoare, A., Wang, H., Meethil, A., Abusleme, L., Hong, B.Y., Moutsopoulos, N.M., Marsh, P.D., Hajishengallis, G. & Diaz, P.I. (2021) A cross-species interaction with a symbiotic commensal enables cell-density-dependent growth and in vivo virulence of an oral pathogen. *ISME Journal* **15**: 1490–1504.

Ivanovski, S., Bartold, P.M. & Huang, Y.S. (2022) The role of foreign body response in peri-implantitis: What is the evidence? *Periodontology 2000* **90**: 176–185.

Jemt, T. (1997) Regeneration of gingival papillae after single-implant

treatment. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **17**: 326–333.

Jung, H.J. & Lee, W. (2023) Difference in microbiome compositions of healthy peri-implant sulcus and peri-implantitis sulcus from the same patient. *Heliyon* **9**: e20303.

Kato, H., Nakamura, T., Nishiguchi, S., Matsusue, Y., Kobayashi, M., Miyazaki, T., Kim, H.M. & Kokubo, T. (2000) Bonding of alkali- and heat-treated tantalum implants to bone. *Journal of Biomedical Materials Research* **53**: 28–35.

Kim, S.-B., Yun, P.-Y., Kim, S.-Y., Yi, Y.-J., Kim, J.-Y. & Kim, Y.-K. (2016) Prospective randomized clinical trial of hydrophilic tapered implant placement at maxillary posterior area: 6 weeks and 12 weeks loading. *The Journal of Advanced Prosthodontics* **8**: 396–403.

Kocar, M., Seme, K. & Hren, N.I. (2010) Characterization of the normal bacterial flora in peri-implant sulci of partially and completely edentulous patients. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **25**: 690–698.

Kormas, I., Pedercini, C., Pedercini, A., Raptopoulos, M., Alassy, H. & Wolff, L.F. (2020) Peri-implant diseases: Diagnosis, clinical, histological, microbiological characteristics and treatment strategies. A narrative review. *Antibiotics* **9**: 1–19.

Kumar, P.S., Mason, M.R., Brooker, M.R. & O'Brien, K. (2012) Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *Journal of Clinical Periodontology* **39**: 425–433.

Le, B.Q., Nurcombe, V., Cool, S.M., van Blitterswijk, C.A., de Boer, J. & LaPointe, V.L.S. (2017) The components of bone and what they can teach us about regeneration. *Materials (Basel, Switzerland)* **11**:

Li, S., Sun, F., Wei, Y., Nie, Y., Wu, X. & Hu, W. (2023) Mucosal bleeding correlates with submucosal microbial dysbiosis in peri-implant mucositis of patients with periodontitis. *Clinical Oral Implants Research* **34**: 947–957.

Lindhe, J. & Meyle, J. (2008) Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology; Group D of European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* **35**: 282–5.

Lu, H., Yan, X., Zhu, B., Zhang, L., Feng, X., Piao, M., Huang, B., Wang, X., Zhang, H., Wang, Q. & Meng, H. (2021) The occurrence of peri-implant mucositis associated with the shift of submucosal microbiome in patients with a history of periodontitis during the first two years. *Journal of Clinical Periodontology* **48**: 441–454.

Maiorana, C., King, P., Quaas, S., Sondell, K., Worsaae, N. & Galindo-

Moreno, P. (2015) Clinical and radiographic evaluation of early loaded narrow-diameter implants: 3 years follow-up. *Clinical Oral Implants Research* **26**: 77–82.

Makowiecki, A., Botzenhart, U., Seeliger, J., Heinemann, F., Biocev, P. & Dominiak, M. (2017) A comparative study of the effectiveness of early and delayed loading of short tissue-level dental implants with hydrophilic surfaces placed in the posterior section of the mandible-A preliminary study. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft* **212**: 61–68.

Mason, M.R., Chambers, S., Dabdoub, S.M., Thikkurissy, S. & Kumar, P.S. (2018) Characterizing oral microbial communities across dentition states and colonization niches. *Microbiome* **6**: 67.

Mavrogenis, A.F., Dimitriou, R., Parvizi, J. & Babis, G.C. (2009) Biology of implant osseointegration. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* **9**: 61–71.

de Melo, F., Milanese, F.C., Angst, P.D.M. & Oppermann, R.V. (2020) A systematic review of the microbiota composition in various peri-implant conditions: data from 16S rRNA gene sequencing. *Archives of Oral Biology* **117**: 104776.

Meredith, N., Alleyne, D. & Cawley, P. (1996) Quantitative determination of the stability of the implant-tissue interface using resonance frequency analysis. *Clinical Oral Implants Research* **7**: 261–267.

Misch, C.E. (1990) Density of bone: effect on treatment plans, surgical approach, healing, and progressive boen loading. *The International Journal of Oral Implantology: Implantologist* **6**: 23–31.

Misch, C.E., Perel, M.L., Wang, H.L., Sammartino, G., Galindo-Moreno, P., Trisi, P., Steigmann, M., Rebaudi, A., Palti, A., Pikos, M.A., Schwartz-Arad, D., Choukroun, J., Gutierrez-Perez, J.L., Marenzi, G. & Valavanis, D.K. (2008) Implant success, survival, and failure: The International Congress of Oral Implantologists (ICOI) pisa consensus conference. *Implant Dentistry* **17**: 5–15.

Mitsias, M., Siormpas, K., Pistilli, V., Trullenque-Eriksson, A. & Esposito, M. (2018) Immediate, early (6 weeks) and delayed loading (3 months) of single, partial and full fixed implant supported prostheses: 1-year post-loading data from a multicentre randomised controlled trial. *European Journal of Oral Implantology* **11**: 63–75.

Mombelli, A. & Décaillet, F. (2011) The characteristics of biofilms in peri-implant disease: Biofilms in peri-implant disease. *Journal of Clinical Periodontology* **38**: 203–213.

Mombelli, A., van Oosten, M.A., Schurch, E. & Land, N.P. (1987) The

microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiology and Immunology* **2**: 145–151.

Monje, A., Ravidà, A., Wang, H.-L., Helms, J.A. & Brunski, J.B. (2019) Relationship between primary/mechanical and secondary/biological implant stability. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **34**: s7–s23.

Morelli, T., Neiva, R., Nevins, M.L., McGuire, M.K., Scheyer, E.T., Oh, T.-J., Braun, T.M., Nör, J.E., Bates, D. & Giannobile, W.V. (2011) Angiogenic biomarkers and healing of living cellular constructs. *Journal of Dental Research* **90**: 456–462.

Morton, D., Gallucci, G., Lin, W.-S., Pjetursson, B., Polido, W., Roehling, S., Sailer, I., Aghaloo, T., Albera, H., Bohner, L., Braut, V., Buser, D., Chen, S., Dawson, A., Eckert, S., Gahlert, M., Hamilton, A., Jaffin, R., Jarry, C., Karayazgan, B., Laine, J., Martin, W., Rahman, L., Schlegel, A., Shiota, M., Stilwell, C., Vorster, C., Zembic, A. & Zhou, W. (2018) Group 2 ITI Consensus Report: Prosthodontics and implant dentistry. *Clinical Oral Implants Research* **29 Suppl 16**: 215–223.

Nicolau, P., Korostoff, J., Ganeles, J., Jackowski, J., Krafft, T., Neves, M., Divi, J., Rasse, M., Guerra, F. & Fischer, K. (2013) Immediate and early loading of chemically modified implants in posterior jaws: 3-year results from a prospective randomized multicenter study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **15**: 600–612.

Nowzari, H., Botero, J.E., DeGiacomo, M., Villacres, M.C. & Rich, S.K. (2008) Microbiology and cytokine levels around healthy dental implants and teeth. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **10**: 166–173.

van Oirschot, B.A.J.A., Bronkhorst, E.M., van den Beucken, J.J.J.P., Meijer, G.J., Jansen, J.A. & Junker, R. (2013) Long-term survival of calcium phosphate-coated dental implants: a meta-analytical approach to the clinical literature. *Clinical Oral Implants Research* **24**: 355–362.

de Oliveira Silva, T.S., de Freitas, A.R., de Albuquerque, R.F., Pedrazzi, V., Ribeiro, R.F. & do Nascimento, C. (2020) A 3-year longitudinal prospective study assessing microbial profile and clinical outcomes of single-unit cement-retained implant restorations: Zirconia versus titanium abutments. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **22**: 301–310.

Osborn, J. & Newesely, H. (1980) Dynamic aspect of the implant bone interface. In: *Dental implants: materials and systems*. (Ed. G. Heimke), pp. 111–123. Carl Hanser Verlag, Munchen.

Padial-Molina, M., Galindo-Moreno, P. & Avila-Ortiz, G. (2009) Biomimetic ceramics in implant dentistry. *Minerva Biotechnologica* **21**: 173–186.

Padial-Molina, M., Galindo-Moreno, P., Fernández-Barbero, J.E., O'Valle, F.,

- Jódar-Reyes, A.B., Ortega-Vinuesa, J.L. & Ramón-Torregrosa, P.J. (2011) Role of wettability and nanoroughness on interactions between osteoblast and modified silicon surfaces. *Acta Biomaterialia* **7**: 771–778.
- Padial-Molina, M., López-Martínez, J., O’Valle, F. & Galindo-Moreno, P. (2016) Microbial profiles and detection techniques in peri-implant diseases: a systematic review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research* **7**: e10.
- Pérez-Chaparro, P.J., Gonçalves, C., Figueiredo, L.C., Faveri, M., Lobão, E., Tamashiro, N., Duarte, P. & Feres, M. (2014) Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *Journal of Dental Research* **93**: 846–858.
- Philip, J., Buijs, M.J., Pappalardo, V.Y., Crielaard, W., Brandt, B.W. & Zaura, E. (2022) The microbiome of dental and peri-implant subgingival plaque during peri-implant mucositis therapy: A randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **49**: 28–38.
- Piattelli, A., Vrespa, G., Petrone, G., Iezzi, G., Annibaldi, S. & Scarano, A. (2003) Role of the microgap between implant and abutment: a retrospective histologic evaluation in monkeys. *Journal of Periodontology* **74**: 346–352.
- Pico, A., Martín-Lancharro, P., Caneiro, L., Nóvoa, L., Batalla, P. & Blanco, J. (2019) Influence of abutment height and implant depth position on interproximal peri-implant bone in sites with thin mucosa: A 1-year randomized clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* **30**: 595–602.
- Pommer, B., Danzinger, M., Leite Aiquel, L., Pitta, J. & Haas, R. (2021) Long-term outcomes of maxillary single-tooth implants in relation to timing protocols of implant placement and loading: Systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Implants Research* **32 Suppl 21**: 56–66.
- Quirynen, M., van der Mei, H.C., Bollen, C.M., Schotte, A., Marechal, M. & Doornbusch, G.I. (1993) An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *Journal of Dental Research* **72**: 1304–9.
- Raghavendra, S., Wood, M.C. & Taylor, T.D. (2005) Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **20**: 425–431.
- Renvert, S., Persson, G.R., Piri, F.Q. & Camargo, P.M. (2018) Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations. *Journal of Periodontology* **89 Suppl 1**: S304–S312.
- Rocuzzo, M., Rocuzzo, A. & Ramanuskaite, A. (2018) Papilla height in relation to the distance between bone crest and interproximal contact point at single-tooth implants: A systematic review. *Clinical Oral Implants Research* **29 Suppl 15**: 50–61.

- Rupérez, E., Manero, J.M., Bravo-González, L.-A., Espinar, E. & Gil, F.J. (2016) Development of biomimetic NiTi alloy: influence of thermo-chemical treatment on the physical, mechanical and biological behavior. *Materials (Basel, Switzerland)* **9**: 402.
- Saghaei, M. & Saghaei, S. (2011) Implementation of an open-source customizable minimization program for allocation of patients to parallel groups in clinical trials. *Journal of Biomedical Science and Engineering* **4**: 734–739.
- Saglanmak, A., Gultekin, A., Cinar, C., Szmukler-Moncler, S. & Karabuda, C. (2021) Effect of soft tissue thickness on crestal bone loss of early loaded implants with platform switching: 1- and 5-year data. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)* **0**: 426–433.
- Sahrman, P., Gilli, F., Wiedemeier, D.B., Attin, T., Schmidlin, P.R. & Karygianni, L. (2020) The microbiome of peri-implantitis: A systematic review and meta-analysis. *Microorganisms* **8**: 661.
- von Salis-Soglio, M., Stübinger, S., Sidler, M., Klein, K., Ferguson, S.J., Kämpf, K., Zlinszky, K., Buchini, S., Curno, R., Péchy, P., Aronsson, B.-O. & von Rechenberg, B. (2014) A novel multi-phosphonate surface treatment of titanium dental implants: a study in sheep. *Journal of Functional Biomaterials* **5**: 135–157.
- Salvi, G.E., Gallini, G. & Lang, N.P. (2004) Early loading (2 or 6 weeks) of sandblasted and acid-etched (SLA) ITI implants in the posterior mandible. A 1-year randomized controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 142–149.
- Schwarz, F., Derks, J., Monje, A. & Wang, H.-L. (2018) Peri-implantitis. *Journal of Periodontology* **89 Suppl 1**: S267–S290.
- Sevilla, P., Cirera, A., Dotor, J., Gil, F.J., Galindo-Moreno, P. & Aparicio, C. (2018) In vitro cell response on CP-Ti surfaces functionalized with TGF- $\beta$ 1 inhibitory peptides. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **29**: 73.
- Siddiqi, A., Milne, T., Cullinan, M.P. & Seymour, G.J. (2016) Analysis of *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *S. aureus* levels in edentulous mouths prior to and 6 months after placement of one-piece zirconia and titanium implants. *Clinical Oral Implants Research* **27**: 288–294.
- da Silva, E.S.C., Feres, M., Figueiredo, L.C., Shibli, J.A., Ramiro, F.S. & Faveri, M. (2014) Microbiological diversity of peri-implantitis biofilm by Sanger sequencing. *Clinical Oral Implants Research* **25**: 1192–1199.
- Sinjab, K., Sawant, S., Ou, A., Fenno, J.C., Wang, H.-L. & Kumar, P. (2023) Impact of surface characteristics on the peri-implant microbiome in health and disease. *Journal of Periodontology*.

Smeets, R., Stadlinger, B., Schwarz, F., Beck-Broichsitter, B., Jung, O., Precht, C., Kloss, F., Gröbe, A., Heiland, M. & Ebker, T. (2016) Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. *BioMed Research International* **2016**: 6285620.

Socransky, S.S. & Haffajee, A.D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **38**: 135–187.

Song, L., Jiang, J., Li, J., Zhou, C., Chen, Y., Lu, H. & He, F. (2022) The characteristics of microbiome and cytokines in healthy implants and peri-implantitis of the same individuals. *Journal of Clinical Medicine* **11**:

Sousa, V., Nibali, L., Spratt, D., Dopico, J., Mardas, N., Petrie, A. & Donos, N. (2017) Peri-implant and periodontal microbiome diversity in aggressive periodontitis patients: a pilot study. *Clinical Oral Implants Research* **28**: 558–570.

Spinato, S., Stacchi, C., Lombardi, T., Bernardello, F., Messina, M. & Zaffe, D. (2019) Biological width establishment around dental implants is influenced by abutment height irrespective of vertical mucosal thickness: A cluster randomized controlled trial. *Clinical Oral Implants Research* **30**: 649–659.

Sun, F., Wei, Y., Li, S., Nie, Y., Wang, C. & Hu, W. (2022) Shift in the submucosal microbiome of diseased peri-implant sites after non-surgical mechanical debridement treatment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **12**: 1091938.

Szmukler-Moncler, S., Piattelli, A., Favero, G.A. & Dubruille, J.H. (2000) Considerations preliminary to the application of early and immediate loading protocols in dental implantology. *Clinical Oral Implants Research* **11**: 12–25.

Tallarico, M., Canullo, L., Caneva, M. & Özcan, M. (2017) Microbial colonization at the implant-abutment interface and its possible influence on periimplantitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Prosthodontic Research* **61**: 233–241.

Tallarico, M., Fiorellini, J., Nakajima, Y., Omori, Y., Takahisa, I. & Canullo, L. (2018) Mechanical outcomes, microleakage, and marginal accuracy at the implant-abutment interface of original versus nonoriginal implant abutments: a systematic review of in vitro studies. *BioMed Research International* **2018**: 2958982.

Van Assche, N., Pittayapat, P., Jacobs, R., Pauwels, M., Teughels, W. & Quirynen, M. (2011) Microbiological outcome of two screw-shaped titanium implant systems placed following a split-mouth randomised protocol, at the 12th year of follow-up after loading. *European Journal of Oral Implantology* **4**: 103–116.

Viornerly, C., Chevolut, Y., Léonard, D., Aronsson, B.-O., Péchy, P., Mathieu, H.J., Descouts, P. & Grätzel, M. (2002a) Surface modification of titanium with

phosphonic acid to improve bone bonding: Characterization by XPS and ToF-SIMS. *Langmuir* **18**: 2582–2589.

Viornerly, C., Guenther, H.L., Aronsson, B.-O., Péchy, P., Descouts, P. & Grätzel, M. (2002b) Osteoblast culture on polished titanium disks modified with phosphonic acids. *Journal of Biomedical Materials Research* **62**: 149–155.

Walker, A.W. & Hoyles, L. (2023) Human microbiome myths and misconceptions. *Nature Microbiology* **8**: 1392–1396.

de Wit, R. & Bouvier, T. (2006) “Everything is everywhere, but, the environment selects”; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology* **8**: 755–758.

Yu, X.-L., Chan, Y., Zhuang, L., Lai, H.-C., Lang, N.P., Keung Leung, W. & Watt, R.M. (2019) Intra-oral single-site comparisons of periodontal and peri-implant microbiota in health and disease. *Clinical Oral Implants Research* **30**: 760–776.

Zheng, H., Xu, L., Wang, Z., Li, L., Zhang, J., Zhang, Q., Chen, T., Lin, J. & Chen, F. (2015) Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants. *Scientific Reports* **5**: 10948.

Zitzmann, N.U. & Berglundh, T. (2008) Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology* **35**: 286–291.



***ANEXOS***



## 10. ANEXOS

### 10.A. Anexo 1: Justificante de Aprobación Ética del Estudio



ugr Universidad  
de Granada

Vicerrectorado de Investigación y Transferencia

#### COMITE DE ETICA EN INVESTIGACION DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

La Comisión de Ética en Investigación de la Universidad de Granada, analizado el informe preliminar del Presidente del Comité en Investigación Humana, emite informe favorable a la metodología en la investigación titulada 'EVALUATION OF B + SURFACE ON EARLY LOADING – EVALUACIÓN DE LA CARGA TEMPRANA DE IMPLANTES CON SUPERFICIE B +' que dirige D./Dña. PABLO GALINDO MORENO, con NIF 26.211.833-K, quedando registrada con el nº: 216/CEIH/2016.

Granada, a 27 de Julio de 2016.

EL PRESIDENTE  
Fdo: Enrique Herrera Viedma



EL SECRETARIO  
Fdo: Fernando Cornet Sánchez del Águila



## 10.B. Anexo 2: Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado para participación en el estudio

### CONSENTIMIENTO INFORMADO E INFORMACIÓN AL PACIENTE

Evaluación de la carga temprana de implantes con superficie B+				
Universidad de Granada	Protocolo N°	Fecha	Paciente Número	Iniciales
	B+ Early – 216CEIH2016	/ /		

## UNIVERSIDAD DE GRANADA

### CONSENTIMIENTO PARA SER PARTE DE UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

#### INFORMACIÓN SOBRE ESTE DOCUMENTO

Usted puede ser elegible para participar en un proyecto de investigación. Este documento le proporcionará toda la información relevante sobre el mismo. Se describirán el estudio así como los riesgos y potenciales beneficios así como las personas y entidades implicadas.

Por favor, lea atentamente esta información. Una vez haya terminado, debe hablar con el investigador a cargo y preguntar tantas preguntas como desee. Usted también podrá mantener una copia de este documento para compartir la información con otras personas que le puedan ayudar en la decisión de participar o no en el estudio, como familiares, amigos u otros doctores.

Si finalmente decide participar, será necesario que firme al final de este documento.

#### 1. INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL ESTUDIO Y LOS INVESTIGADORES

**1.1. Título del Estudio:** Evaluación de la carga temprana de implantes con superficie B+

**1.2. Fuente de financiación del proyecto:** MIS Implants Technologies Ltd.

**1.3. Datos del Investigador Responsable:**

Nombre y apellidos: Pablo Galindo Moreno

D.N.I.: 26211833-K

Centro, teléfono, correo electrónico: Facultad de Odontología de Granada, 958249032, pgalindo@ugr.es

**1.4. Datos de Investigadores Colaboradores:**

Miguel Padiá Molina, 74721686-E, Licenciado en Odontología, mipadiá@ugr.es

Lourdes Gutiérrez Garrido, 75153484-H, Licenciada en Odontología, lggarrido@correo.ugr.es

Elena Sánchez Fernández, 24152317-V, Licenciada en Medicina y Cirugía, elenasf@ugr.es

Francisco O'Valle Ravassa, 24164178-X, Licenciado en Medicina y Cirugía, fovalle@ugr.es

Andrés Catena Martínez, 25966386-F, Licenciado en Psicología, acatena@ugr.es

#### 2. ¿PARA QUE ES ESTE ESTUDIO?

El objetivo principal de esta propuesta es evaluar la seguridad y eficacia de los implantes tratados con superficie B+ para la carga protésica temprana.

Para lograr ese objetivo, nos planteamos los siguientes objetivos de trabajo:

**CONSENTIMIENTO INFORMADO E INFORMACIÓN AL PACIENTE****Evaluación de la carga temprana de implantes con superficie B+**

1. Analizar el éxito clínico y radiográfico de los implantes dentales con superficie B+ después de un protocolo de carga protésica convencional o temprana.
2. Evaluar el nivel de hueso marginal alrededor de los implantes dentales con superficie B+ después de un protocolo de carga protésica convencional o temprana.
3. Determinar los marcadores inflamatorios en fluido peri-implantario alrededor de los implantes dentales con superficie B+ después de un protocolo de carga protésica convencional o temprana.
4. Determinar el perfil microbiológico alrededor de los implantes dentales con superficie B+ después de un protocolo de carga protésica convencional o temprana.

**3. ¿QUIÉN PARTICIPARÁ EN ESTE ESTUDIO?**

La participación en el estudio es completamente voluntaria, no tiene que participar si no lo desea. Además, puede dejar el estudio en cualquier momento sin ningún perjuicio para usted o sus futuros tratamientos.

**3.1. ¿Quién puede participar?**

Podrán participar en el estudio los pacientes que cumplan los siguientes requisitos:

Paciente de entre 18 y 75 años con falta de un diente en el área premolar o molar con los dientes opuestos y adyacentes presentes.

**3.2. ¿Quién no puede participar?**

No podrán participar pacientes que hayan recibido injerto de hueso en la misma etapa ni pacientes fumadores de más de 10 cigarrillos al día o que sufran diabetes no controlada tipo 1 o 2 ( $HgA1c > 8$ ), enfermedades autoinmunes o inflamatorias conocidas, trastornos hematológicos graves, tales como hemofilia o leucemia, infección local o sistémica que pueda dificultar la cicatrización normal (por ejemplo, patología periapical extensa), disfunción hepática o renal, en tratamiento contra el cáncer o dentro de los 18 meses posteriores, larga historia de uso de bifosfonatos orales (es decir, 10 años o más), historia de uso de bifosfonatos intravenosos, historia de uso de antibióticos o medicamentos conocidos por modificar la inflamación o el sistema inmunológico 3 meses antes de la inserción del implante, enfermedades óseas graves (p. ej., enfermedad de Paget del hueso), mujeres embarazadas o madres lactantes, ni pacientes incapaces o no dispuestos a seguir las instrucciones relacionadas con los procedimientos de estudio que se indican en el presente documento.

**3.3. ¿Cuántos pacientes se incluirán?**

Para que los resultados del estudio sean científicamente válidos, se necesitan un total de 30 pacientes, 15 por grupo.

**4. ¿QUÉ IMPLICA PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?****4.1. ¿Qué pasará si participo?**

Tras el examen inicial de los criterios de inclusión/exclusión, cada paciente será sometido a un examen médico y dental completo con un examen intraoral y radiográfico específico. Si no está disponible, se obtendrá en este momento una radiografía periapical de los sitios de interés para determinar la elegibilidad. Los candidatos que presentan signos clínicos o radiográficos de enfermedad periodontal activa u otras condiciones dentales se excluirán del estudio hasta que se proporcione el tratamiento y se alcance la estabilidad adecuada.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO E INFORMACIÓN AL PACIENTE****Evaluación de la carga temprana de implantes con superficie B+**

Si cumple los criterios, se insertará el implante en la posición designada siguiendo un protocolo convencional de una etapa. Tras esto, el paciente será distribuido al azar para recibir la prótesis a uno de los tiempos definidos por el estudio: Control (la prótesis se comenzará a las 8 semanas de la colocación del implante); Test (la prótesis se comenzará a las 4 semanas de la colocación del implante). Al momento indicado, se tomarán las impresiones y se fabricará una corona de metal cerámica que se atornillará dos semanas más tarde. Se realizarán los ajustes oclusales necesarios para evitar sobrecarga.

No podemos saber en qué grupo le tocará participar porque se asigna de forma aleatoria para evitar cualquier influencia sobre los resultados del estudio.

**4.2. ¿Se tomarán algunas muestras?**

Sí. Para poder analizar los cambios asociados a la colocación de cada tipo de implante, se tomarán muestras del fluido y la placa dental alrededor del implante. Además, se obtendrán radiografías estandarizadas periapicales de la zona para medir la pérdida de hueso alrededor de ellos, si existe. Para valorar estos cambios desde el punto de vista del perfil inflamatorio global, se tomarán muestras de sangre antes de la colocación del implante, a los 3, 6 y 12 meses. También tomaremos una serie de medidas clínicas para confirmar la salud de los tejidos alrededor del implante y del resto de la boca, incluyendo Índice de Placa (PI), Índice Gingival (GI), profundidad de sondaje (PD), margen gingival (GM) y sangrado al sondaje (BOP) en seis sitios alrededor del implante (mesiobucal, bucal, brazo, mesiolingual, lingual y distolingual). También se medirá el grosor de la encía (GW) y la encía queratinizada (KG) en el momento de la toma de impresiones.

**4.3. ¿Cuántas veces tendré que venir a la clínica y por cuánto tiempo?**

En la siguiente tabla se describe la planificación de cada una de las visitas y su duración aproximada.

VISITAS	Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4	Visita 5	Visita 6	Visitas 7-10
	<b>PROCEDIMIENTOS</b>	Screening	Colocación del implante	1 semana post-implante	-14 días ( $\pm$ 2 días) (4 u 8 semanas post-implante)	Baseline	7 días ( $\pm$ 2 días)
Consentimiento informado							
Historia médica y dental							
Colocación del implante							
Retirada de sutura							
Impresiones							
Colocación de la prótesis							
Toma de fluido y placa							
Muestras de suero							
Examen radiológico							
Medidas clínicas							
Duración de la visita	0.5 horas	1 hora	0.5 horas	0.5 horas	0.5 horas	0.5 horas	0.5 horas

En total, usted deberá venir a la clínica 10 veces más, además de hoy.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO E INFORMACIÓN AL PACIENTE****Evaluación de la carga temprana de implantes con superficie B+****4.4. ¿Cuándo se acabará mi participación en el estudio?**

El estudio tiene una duración de 12 meses desde el día de colocación de la prótesis, unos 14 meses en total.

Las muestras que tomemos las mantendremos congeladas hasta que tengamos las de todos los pacientes y podamos empezar a analizarlas. Una vez analizadas, las muestras sobrantes serán destruidas.

**5. ¿CUÁLES SON LOS RIESGOS Y BENEFICIOS?****5.1. ¿Qué riesgos hay si decido participar en el estudio? ¿Qué harán los investigadores para reducir esos riesgos?**

El presente estudio presenta una serie de riesgos que deben ser considerados:

- 1) La participación en el estudio puede suponer un mayor número de visitas que en un tratamiento rutinario. Los pacientes participantes serán informados oportunamente y valorados extensamente por su tiempo y buena disposición por los beneficios potenciales de los resultados de este estudio. En todo momento se informará al paciente de su participación voluntaria y su derecho a que sea interrumpida si así lo desea. No obstante, se harán los esfuerzos oportunos para minimizar la pérdida de seguimiento del paciente que pueda comprometer los resultados finales del estudio y, por tanto, minimizar el esfuerzo realizado por el resto de pacientes, la entidad financiadora y el equipo clínico.
- 2) Todos los procedimientos de colocación de implantes conllevan un riesgo que no se incrementa por la participación en este estudio. Algunos de los riesgos incluyen infección, inflamación o sangrado de la zona quirúrgica, o fracaso de osteointegración del implante. En caso de que algo así ocurra, se tomarán las medidas necesarias para su tratamiento, farmacológico o quirúrgico.
- 3) Si es necesario, se recetarán los necesarios anti-inflamatorios (ibuprofeno o metamizol) y/o antibióticos (amoxicilina o clindamicina).
- 4) Como consecuencia de ser asignado a uno u otro grupo, la prótesis le será colocada de forma temprana o convencional. En el caso de la colocación temprana puede ocurrir que el implante no esté totalmente osteointegrado (estable en el hueso). En este caso, se colocará otro implante y usted recibirá el tratamiento de forma convencional.
- 5) En algunas ocasiones pueden existir complicaciones posteriores tras la colocación de la prótesis, como fractura de la misma, desajuste o alojamiento. En estos casos se procederá como de rutina reparando el defecto o fabricando una nueva prótesis.
- 6) La exposición a las radiografías propuestas supone una mínima exposición radiológica, tanto para el personal como para el paciente. Aún así se emplearán las medidas de protección rutinarias que incluyen mandil de plomo y collar tiroideo.
- 7) La esterilidad y precaución frente a exposiciones accidentales a patógenos serán preservadas en todo momento mediante el uso de material estéril y de un solo uso junto con las barreras de prevención universales (guantes, mascarilla, etc.).
- 8) Todas las muestras serán almacenadas a -80°C hasta su análisis. No se incluirá ningún tipo de identificación personal sino sólo el número de paciente de estudio.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO E INFORMACIÓN AL PACIENTE

## Evaluación de la carga temprana de implantes con superficie B+

**5.2. ¿Qué pasará si sufro un daño o sufro alguna consecuencia como resultado de mi participación en este estudio?**

El estudio propuesto no supone un riesgo superior al que tendría en cualquier otra circunstancia en la que usted recibiera tratamiento mediante implantes dentales. Como cualquier procedimiento médico, no está completamente exento de riesgo.

**5.3. Si participo en este estudio, ¿qué pasará con mi tratamiento regular? ¿Podré participar en otros estudios?**

Usted debe seguir su tratamiento médico habitual, es imprescindible. También es imprescindible que nos comunique la medicación que toma y cualquier aspecto relacionado con su salud porque puede ser importante para el tratamiento que le vamos a hacer.

No es recomendable participar en más de un estudio a la vez si éste implica la toma de algún medicamento adicional. En cualquier caso, consulte con el Investigador para aclararlo.

**5.4. ¿Se me informará si durante mi participación en el estudio se descubre algo que pueda cambiar mi deseo de permanecer en el estudio?**

Sí. El investigador responsable le informará de cualquier información nueva que pueda aparecer relacionada con el presente estudio. Puede incluso que se necesite que firme un consentimiento nuevo para permanecer en el estudio.

**6. ¿HAY OTRAS OPCIONES?****6.1. Si decido no participar en el estudio, ¿qué otras opciones tengo?**

Su participación en el estudio es completamente voluntaria. Si decide no participar, esto no supondrá ningún impedimento para su futura atención médica o dental. De hecho, usted será aconsejado sobre las mejores opciones existentes a juicio del investigador responsable aunque éstas impliquen la no inclusión en el estudio.

**7. ¿CUÁNDO TERMINA EL ESTUDIO?****7.1. Si quiero dejar el estudio, ¿qué debo hacer?**

Usted es libre de dejar el estudio en cualquier momento. Si así lo decide, deberá comunicárselo al investigador responsable, cuya información se encuentra en la Sección 10 de este documento. Si opta por explicar las razones para dejar el estudio, es posible que estas se incluyan en su hoja clínica de seguimiento.

**7.2. ¿Puedo ser excluido del estudio por el investigador responsable aunque yo quiera continuar?**

Sí. Existen diversas razones por las que esto puede pasar, entre las que se incluyen:

- El investigador cree que no es lo mejor para usted.
- Usted debe ser excluido por las razones expuestas en el punto 3.2.
- Usted no sigue las recomendaciones del investigador o falta a sus visitas de seguimiento.
- El estudio es suspendido o cancelado.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO E INFORMACIÓN AL PACIENTE****Evaluación de la carga temprana de implantes con superficie B+****8. ¿CUÁLES SON LOS COSTES? ¿Y LOS BENEFICIOS?****8.1. ¿Cómo me beneficiaré de este estudio?**

En primer lugar, usted recibirá el tratamiento mediante implantes en el sitio seleccionado para el estudio de forma gratuita tanto si le corresponde un grupo como otro en compensación por las molestias ocasionadas por el número de visitas, desplazamientos o ausencias laborales así como la toma de muestras y su propio tiempo. No obstante, la restauración protésica sobre el implante correrá necesariamente de su cuenta al tratarse de un servicio externo aunque el precio final será algo menor que el de mercado.

Durante las visitas de seguimiento y al final del estudio se le aconsejará de forma personalizada sobre otras posibles enfermedades bucodentales y cómo prevenirlas.

Además, la participación de cualquier persona en proyectos de investigación supone que se pueda conocer más sobre las enfermedades, nuevos tratamientos, medidas de prevención, etc., que en definitiva contribuyen a la mejora de la sociedad como conjunto y es por esto que el equipo de investigación le estará muy agradecido no sólo en su nombre si no también en el del resto de pacientes y de la comunidad científica.

Es posible que al inicio o durante el curso del estudio, su enfermedad cambie o aparezca alguna otra patología nueva no relacionada de la que usted tendrá que hacerse responsable. Sólo los tratamientos directamente relacionados con este estudio serán gratuitos para usted, si bien existen gran cantidad de ellos que se realizan en la Facultad de Odontología a precios reducidos.

**8.2. ¿Se me pagará por participar en el estudio?**

No, a usted no se le pagará por participar en el estudio.

**8.3. ¿Puede alguien hacer negocio con los resultados de este estudio?**

Es posible que, en parte, se pueda comercializar alguno de los productos utilizando como herramienta de marketing algunos de los resultados de este estudio. Los investigadores miembros del equipo no reciben compensación por la venta de estos productos. El beneficio se centra en lo mencionado en el punto 8.1. sobre beneficios para la comunidad y mejora de los conocimientos científicos.

**9. ¿CÓMO SE TRATARÁ LA INFORMACIÓN RECOPIADA?****9.1. ¿Cómo se protegerá mi privacidad?**

Para mantener su privacidad, todos los procedimientos se realizarán de forma privada en un ambiente clínico de total confidencialidad.

Todos los datos recopilados durante el desarrollo del estudio serán incorporados en una base de datos anonimizada en formato electrónico protegida por contraseña en un ordenador también protegido mediante contraseña. Ambas contraseñas serán conocidas sólo por el investigador responsable del estudio y los miembros del equipo. Como regla fundamental, los números de identificación personal y su correspondiente número de identificación en el estudio sólo serán almacenados en un archivo físico guardado bajo llave sólo accesible al investigador principal. En caso de necesitarse cualquier tipo de intercambio de información de forma electrónica, sólo se realizará mediante sistemas encriptados y nunca conteniendo ningún tipo de dato de identificación personal.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO E INFORMACIÓN AL PACIENTE****Evaluación de la carga temprana de implantes con superficie B+****9.2. ¿Qué información será compartida con otros investigadores? ¿Por qué?**

Al firmar este documento, usted autoriza al investigador responsable del estudio para que pueda requerir información sobre su salud. Esto es así para evitar duplicidades en técnicas diagnósticas y obtener la mayor información posible, primero, para poder darle una mejor atención y, segundo, para obtener resultados más exactos al final del estudio.

Los resultados de este estudio se podrán publicar artículos científicos en revistas especializadas y/o presentados en reuniones científicas o conferencias públicas. En ninguno de estos casos se empleará información personal de ningún paciente concreto si no los valores numéricos obtenidos tras los análisis matemáticos de los mismos.

**9.3. ¿Qué pasará con mi información si decido dejar el estudio o cuando éste termine?**

Como regla general, si deja el estudio no se usará la información obtenida de usted pero es posible que sea mantenida hasta que sea destruida de forma segura. En cualquier caso, toda esta información será mantenida de forma segura siguiendo los protocolos de protección de datos y privacidad del paciente establecidos por la Universidad de Granada. Si usted lo desea, esta información será destruida inmediatamente para lo que deberá ponerse en contacto con el investigador responsable por las vías indicadas en la sección 10.

**10. ¿CUÁL ES LA INFORMACIÓN DE CONTACTO SOBRE EL ESTUDIO?**

Usted puede contactar al investigador responsable para obtener más información sobre el estudio, preguntas sobre los procedimientos o tratamientos realizados durante el estudio, ante cualquier eventualidad, enfermedad, lesión o cualquier otro problema de salud, para abandonar el estudio antes de que finalice o por cualquier otro motivo que considere oportuno.

**Investigador Responsable:** Dr. Pablo Galindo Moreno

**Dirección:** Colegio Máximo, Campus Universitario de Cartuja, S/N, C.P. 18071 (Granada)

**Teléfono:** 958249032

**Correo electrónico:** pgalindo@ugr.es

**11. ¿QUÉ DOCUMENTOS SE ME ENTREGARÁN TRAS ESTA VISITA?**

Su firma en la sección siguiente significa que usted ha recibido una copia de este documento completo.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO E INFORMACIÓN AL PACIENTE****Evaluación de la carga temprana de implantes con superficie B+****12. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE**

D./Dña. .... con D.N.I. No.....  
y fecha de nacimiento ...../...../.....

Declaro que:

1. He leído (o me han leído) la hoja de información al paciente del proyecto titulado “Evaluación de la carga temprana de implantes con superficie B+”.
2. Entiendo que este estudio ha sido supervisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación Humana de la Universidad de Granada, quedando registrado con el número 216/CEIH/2016.
3. He comprendido la investigación que se va a realizar con mi participación y he tenido la oportunidad de resolver cualquier duda al respecto.
4. Asimismo, se me ha informado de que:
  - Se hace constar que el participante manifiesta expresamente decir la verdad en sus respuestas para garantizar los datos reales sobre su estado físico o salud o los que se le solicitan (art. 23.1. L.I.B.).
  - Tengo derecho a no otorgar mi consentimiento a participar y a revocarlo en cualquier momento del estudio (art. 4.3. L.I.B.).
  - La falta de consentimiento a iniciar el estudio o su revocación una vez iniciado no me supondrá perjuicio alguno (en cualquier otro derecho) o discriminación (art. 4.4 y 6. L.I.B.).
  - Seré informado, si así lo deseo, de los datos que se obtengan durante la investigación (art. 4.5 y 27.2. L.I.B.) y de la forma de obtener dicha información (art. 15.2. L.I.B.).
  - Tengo derecho a decidir que no se me comuniquen los datos de la investigación (con las excepciones legales pertinentes) (art. 4.5. L.I.B.).
  - Los datos que se obtengan con mi participación en la investigación son anónimos y si al publicarlos hay que mencionar mi nombre será precisa mi autorización (art. 15.2. L.I.B.). Los datos recogidos en esta investigación serán anónimos y su uso se regirá por lo recogido en la legislación vigente en relación a la Protección de Datos de Carácter Personal. Mis datos personales serán tratados conforme a los términos establecidos en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, pudiendo ejecutar en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, poniéndome en contacto con el investigador principal según los datos incluidos en el documento de información al participante.
5. Acepto participar de forma voluntaria en el proyecto arriba mencionado.

Fdo. \_\_\_\_\_  
(Investigador)

Fdo. \_\_\_\_\_  
(Paciente)

Lugar y fecha

**10.C. Anexo 3: Publicación**10.C.1. Referencia completa

Galindo-Moreno P, Gutierrez-Garrido L, Lopez-Chaichio L, Guerra-Lorenzo C, Rodriguez-Alvarez R, Padial-Molina M. Crestal bone changes around early vs. conventionally loaded implants with a multi-phosphonate coated surface: A randomized pilot clinical trial. *Clinical Oral Implants Research*. 2021;32(1):75-87.

Dirección URL: <https://doi.org/10.1111/clr.13681>

10.C.2. Indicios de Calidad

- Índice de impacto de la revista: 5,021
- Orden en la categoría “Dentistry, Oral Health and Medicine”: 10 de 92
- Cuartil “Dentistry, Oral Health and Medicine”: Q1
- Número de citas recibidas (a 24 de enero de 2024):
  - o Scopus: 2
  - o Google Scholar: 2

10.C.3. Publicación

Con el fin de evitar conflictos de copyright, aunque el artículo se publicó en acceso abierto, no se incluye el documento en pdf generado por la revista sino la versión final aceptada para publicación.

---

**CRESTAL BONE CHANGES AROUND EARLY VS. CONVENTIONALLY LOADED IMPLANTS WITH A MULTIPHOSPHONATE COATED SURFACE: A RANDOMIZED PILOT CLINICAL TRIAL**

Pablo Galindo-Moreno, Lourdes Gutierrez-Garrido, Lucia Lopez-Chaichio, Claudia Guerra-Lorenzo, Roque Rodriguez-Alvarez, Miguel Padiál-Molina.

Department of Oral Surgery and Implant Dentistry, School of Dentistry, University of Granada, Granada, Spain.

**Running title:** Crestal bone changes of early loaded implants.

**Key words:** marginal bone loss; early loading; implant surface.

**ABSTRACT**

**Objectives:** To compare the marginal bone level around implants with a thin multi-phosphonate coated surface after either an early or conventional loading protocol.

**Material and methods:** A randomized pilot clinical trial was conducted. Dental impressions were obtained after either 4 (test) or 8 weeks (control) and single crowns screwed-in 2 weeks later. Several variables were evaluated including radiographical marginal bone level (MBL), patient's level variables and those related to the restoration and surrounding tissues. These data were obtained at several time points up to a 1-year follow-up.

**Results:** Thirty-four patients were included in the study, 18 assigned to the test group. No differences at implant placement were detected for tissue thickness, keratinized mucosa nor any other clinical or radiological variable. At the time of impressions, tissue was thinner in the test group (2.30 (0.46) vs. 2.78 (0.66) mm, test vs. control, respectively;  $p=0.012$ ) so shorter abutments were used in this group. Regardless, no significant changes in marginal bone level were detected neither within group along time nor between groups. The average MBL at the 1-year follow-up was -0.15 (0.32) vs. -0.22 (0.37) ( $p=0.443$ ) (test vs. control, respectively). None of the clinical or radiological variables evaluated had a determinant influence on the MBL at any visit nor group.

**Conclusion:** The use of implants with a multi-phosphonate coated surface for early loading offers successful radiographical outcomes 1 year after loading. MBL over time was not affected by taking the impressions 4 or 8 weeks after implant placement and loading them 2 weeks later.

**INTRODUCTION**

It's been almost 50 years since introduction of the term Osseointegration. The biological process per se has been described from a histological point of view in many experimental models; the sequence of biological events that occur in bone healing around an implant inserted in the different maxillary areas are well identified (Davies 2003). However, this knowledge does not seem to translate into daily clinical activity. In this sense, in the early years of Implantology, the recommendation was to wait 6 months before the prosthetic load in the upper maxilla, and 3 months in the jaw, due to the higher bone density of this area (Szmukler-Moncler et al. 2000). Nowadays, it is known that 8 weeks is more than enough to obtain bone healing around the implants

(Ghimire et al. 2018). In *in vitro* experimentation, 28 days was sufficient to determine bone formation, and in animal models we have learned that bone requires a period of around 28 days for complete healing or remodeling (Cirera et al. 2020).

Thus, from this point of view, there has been a perfect clinical description of the immediate, early or delayed loading protocols in implant dentistry, and how long we have to wait to restore the implants placed in these clinical circumstances (Cochran et al. 2004; Morton et al. 2018). Nevertheless, this is not based on precise histological support in humans. Similarly, we have a precise description of what primary and secondary stabilities are and how is the transition between the two during the bone healing process (Raghavendra et al. 2005). Subsequently, clinical recommendations on the minimum insertion torque, or other tools such as radiofrequency analysis and which values are essential to ensure long-term clinical success in such implants have been developed (Herrero-Climent et al. 2020). However, even though bone healing processes may be influenced by many local and systemic factors, based on current knowledge, dental professionals have not been able to establish clear criteria in post-surgical waiting times for the rehabilitation of our patients. In some cases, this waiting time is even established by “patient’s demands”.

In this sense, it must be mentioned that bone biology is simply biology, and tissue events occur as they do, beyond the consensuses and classifications we strive to establish. Therefore, research efforts in Implant Dentistry have been targeted at reducing waiting times by accelerating biological processes that are already known in bone healing. To this end, numerous strategies are being used, framed in the field of biomimetics. These include modifications of the physical-chemical features of the implant surface (Padial-Molina et al. 2011), addition of proteins with biological bone actions (Sevilla et al. 2018; Cirera et al. 2020), drugs such as melatonin (Galindo Moreno et al. 2016), adsorption of ions with certain cellular targets (Ellingsen et al. 2004), or the use chemical molecules with action on calcium and phosphate metabolism (Rupérez et al. 2016).

However, the results obtained with so many different methods have not been conclusive, mainly due to the difficulty of maintaining the integrity of the layers on the surface (Padial-Molina et al. 2009). One of those surface treatments is based on a permanently adhered monolayer of a multiphosphonic acid on the surface of the implant that does not modify the surface topography (Viorneri et al. 2002a). *In vitro*, this modified surface has been shown to induce the production of type I collagen (16%) without cytotoxic effects (Viorneri et al. 2002b). *In vivo*, this treated surface has shown that early bone mineralization can be increased, resulting in better fixation and stability after only 2 weeks (32% higher than control) (von Salis-Soglio et al. 2014). In fact, it was also shown that even one year after implantation, bone-to-implant contact was 39% higher for implants with treated surface compared to control (von Salis et al. 2012). An initial clinical report confirmed the clinical safety of this surface modification after a healing period of 6 months in the maxilla and 3 months in the mandible (Esposito et al. 2013). However, the main claimed advantage of this modified surface, i.e., acceleration of osseointegration, has not been tested on shorter loading protocols than traditional ones. Moreover, its effect on marginal bone loss, a fundamental factor in predicting the occurrence of peri-implantitis (Galindo-Moreno et al. 2015), is unknown. As clinicians, the question using this type of modified surface

is whether we can safely reduce waiting times in our patients, and whether this reduction in times will affect the long-term maintenance of the implants.

Therefore, the purpose of this study was to compare the marginal bone level around implants with a thin multi-phosphonate coated surface after either an early or conventional loading protocol.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study design**

This controlled randomized clinical trial was designed as a consecutive enrollment prospective one-center study. A minimum of 30 patients was set to be included in the study with a parallel 1:1 allocation ratio to either a control group (conventional loading, impressions taken 8 weeks after implant placement) or test group (early loading, impressions taken 4 weeks after implant placement).

The protocol was reviewed and approved by the Ethical Committee for Research in Humans of the University of Granada, Spain (216/CEIH/2016). Moreover, this study was registered in [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) under protocol number NCT03059108. The protocol was developed in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association, the Clinical Research Guide to Medical Devices for Humans (ISO 14155:2011) and the General Guide to Good Clinical Practices (2001/20/EC). Every patient was previously informed in details about the study and all of them signed a written informed consent before the study procedures were initiated.

Reporting of this trial followed the CONSORT guidelines.

### **Participants**

Patients referred to the Oral Surgery and Implant Dentistry Clinic of the School of Dentistry, University of Granada, Spain, were evaluated for participation in this study.

The inclusion criteria defined that the patient must be of legal age (older than 18 years) and younger than 75 years, mentally and physically healthy, with an absent tooth in the premolar or molar area in the maxilla or the mandible, with the presence of natural neighboring and antagonist teeth. The main exclusion criteria listed diseases that could alter healing or bone metabolism (uncontrolled diabetes, diagnostic osteoporosis, etc.), taking drugs that could cause the same effects (bisphosphonates, long-time corticosteroids intake, RANK inhibitors, etc.), smokers of more than 10 cigarettes/day, need for bone grafting in the same therapeutic session and pregnant women. Candidates presenting clinical and/or radiographic signs of active periodontal disease or other dental conditions would be withheld from the study until treatment was adequately provided and stability was achieved.

### **Interventions**

During the first screening appointment, a full medical history was reviewed as well as clinical and radiological diagnostic tests. Patients which met the inclusion criteria underwent the surgical phase during a second session. All the surgeries were conducted by the same surgeon (PG-M) assisted by the same periodontist (LG-G). Control of the study's variables was done by the same person (MP-M). A full-thickness mucoperiosteal supracrestal incision was made including the papillae of the adjacent teeth. The flap

was raised to the limit of the inserted gingiva at the vestibular and lingual aspects. Surgical drilling of the implant bed was carried out following the C1 implant placement protocol established by the company (MIS, Bar Lev Industrial Park, Israel); it always ended with the single-use final drill. Drilling was performed at a speed of 1200 rpm under profuse irrigation of sterile saline with a maximum 55 Ncm torque. C1 implants with the multi-phosphonate coated surface (MIS Implants Technologies) were then inserted with hand-piece and motor; maximum insertion torque was 55 Ncm, and finished with wrench if needed, always with torque below 80 Ncm. Healing followed a 1-stage protocol in order to perform faster loading. The flap was carefully sutured with 4/0 surgical silk (Laboratorios Aragó, Barcelona, Spain); it included a stitch on each adjacent papilla. Group allocation of the patient was subsequently determined in order to blind the surgeon during the surgical procedure. Dental impressions were taken at the designated time (4 or 8 weeks after implant placement) and sent to the prosthesis laboratory technician. A metal-ceramic screw-retained crown was fabricated over a Ti-Base abutment; it was delivered approximately two weeks later. An overview of the study sequence is presented in Figure 1A.

### **Outcomes**

The primary outcome measure was based on marginal bone level (MBL) parameters, particularly changes from loading to the 1-year follow-up. For this purpose, standardized periapical images of the area were obtained with the assistance of an intraoral x-ray positioner at implant placement, prosthesis delivery, 3, 6, and 12 months. Linear measurements of the implant marginal bone level were measured by using the software Image J (NIH) and taking the implant shoulder as reference. Positive values indicated the bone was coronal to the shoulder while negative values were recorded when the bone was apical to the reference point. Changes over time were then calculated. Each image was internally calibrated with the implant diameter, as this was always visible in the radiography. Additionally, other obtained measurements were: the distance between the implant and each adjacent tooth, the bone level at the adjacent teeth taking the cement-enamel junction as reference, and the distance from the contact point of the crown to the bone crest. Mesial and distal measurements were obtained for each implant and then averaged.

Clinical data at the time of implant placement included the mesio-distal distance between the adjacent teeth, occlusal height, bucco-lingual width (before and after the raising of the flap), vertical soft tissue thickness and width of keratinized mucosa. Additionally, vertical soft tissue thickness was also measured at the time of dental impressions and prosthesis delivery. From prosthesis delivery to final follow-up, the width of keratinized mucosa as well as the papilla index (Jemt 1997) (0=No papilla; 1=<50% of filling of the interproximal area; 2= $\geq$ 50% of filling; 3=Ideal papilla; 4=Overgrowth) were also registered. Healing index (Morelli et al. 2011) was also evaluated up to prosthesis delivery: 0=Mature wound healing; 1=Erythema; 2=Bleeding; 3=Flap mobility; 4=Suppuration; and 5=Necrosis.

Additionally, samples of peri-implant crevicular fluid and intrasulcular plaque were collected at different time points for future analyses.

### **Sample size**

The current study was categorized as a pilot study since no previous research have been published on marginal bone levels around implants with this surface treatment neither in an early or conventional loading protocol nor with the macroscopic implant design and prosthetic connections used here. Only a previous study with a longer loading protocol compared the multi-phosphonate coated surface modification with a non-modified surface. It included 23 patients by the beginning of the trial and detected a trend on marginal bone loss after one year (Esposito et al. 2013). Therefore, it was decided to increase the sample size to at least 30 patients.

### **Randomization**

To prevent imbalance between groups in terms of gender, location of the missing tooth and type of bone, a restricted randomization by minimization protocol was performed by using a software designed for this purpose (Saghaei 2011). This was intended to maximize the statistical power and generalizability of the study findings. A clinic staff member not involved in the clinical trial performed the allocation.

### **Blinding**

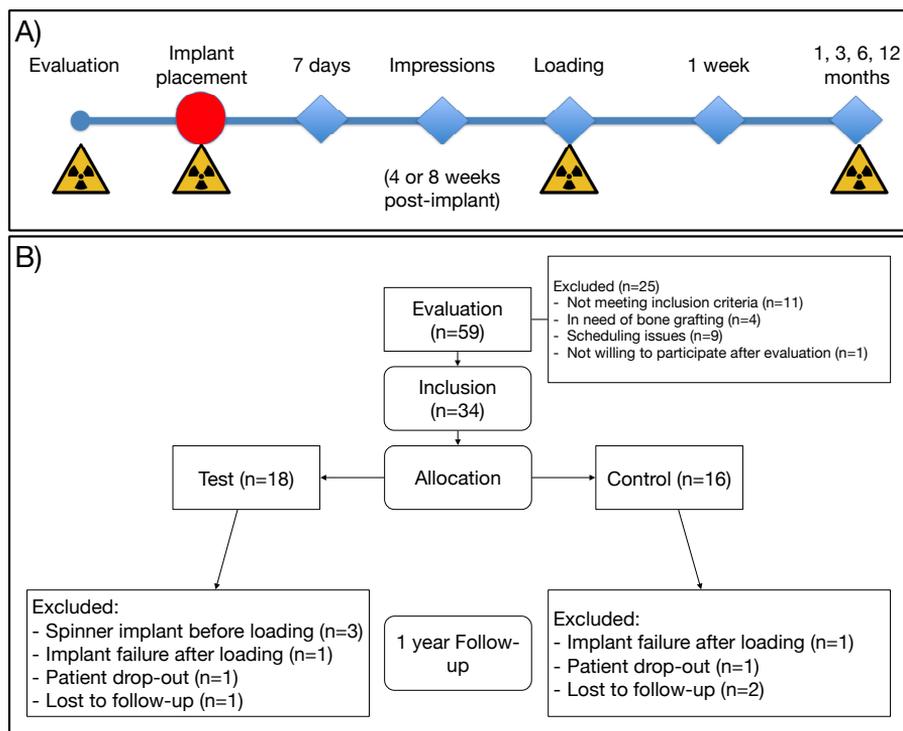
Although neither the patient nor the restorative dentist (LL-C) could be masked because of the loading protocol, both the surgeon (PG-M), assistants in charge of examination and follow-ups (LG-G, CG-L, RR-A) and the data analyst (MP-M) were blinded, as group allocation was set after implant placement and all data was re-coded and analyzed in a blinded manner.

### **Statistical analysis**

An intention-to-treat plan was set for statistical analyses. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Percentages, means, standard deviations and errors were calculated for each type of variable. Categorical data have been evaluated with chi-squared test. Because of the sample size, the primary and secondary continuous outcome measures have been analyzed by non-parametric Wilcoxon rank sum test and general linear model for over time analyses with pair-wise comparisons of means further evaluated by Tukey contrasts. All tests have been performed using R (version 3.6.2) (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## **RESULTS**

59 patients were evaluated for inclusion from February 2017 to January 2019 and 34 met the enrollment criteria; 18 of them were assigned to the test group (dental impressions 4 weeks after implant placement). At the 1 year follow-up only 12 patients were evaluated in each group; 6 and 4 patients (test and control groups, respectively) were not analyzed because of lost to follow-up (1 and 2, respectively; patients were not reached upon contact by several methods nor attended their planned follow-up visit), the patient dropped out of the study (1 in each group, decided and communicated their intention to not continue the follow-up visits) or the implant failed after loading (1 in each group). In addition, spinner implants at the time of impressions (3 in the test group) were also excluded from the study. Inclusion, exclusion, allocation and follow-up is summarized in Figure 1B.



**Figure 1:** A) Overview of the study sequence and B) CONSORT diagram of screening, allocation and follow-up.

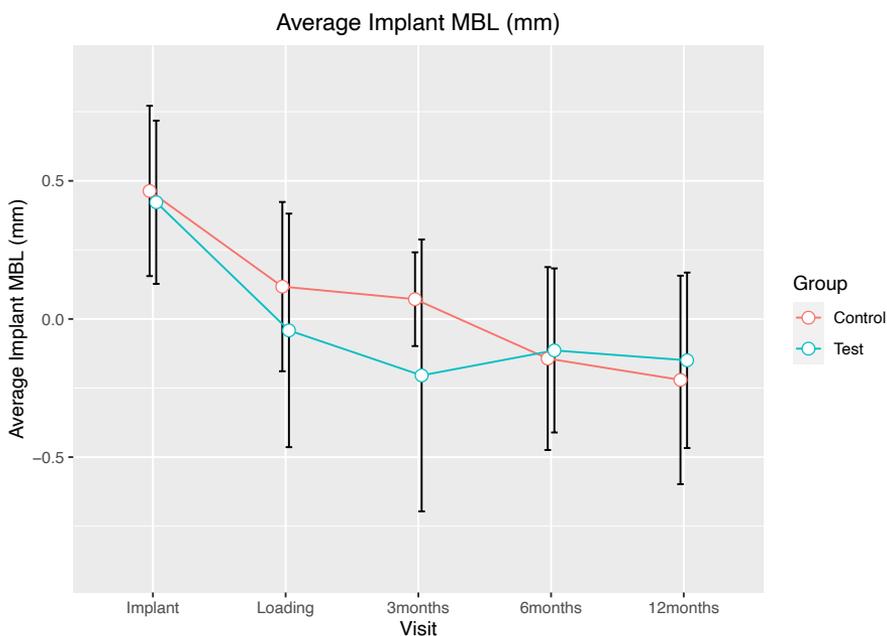
Of the included patients, as summarized in Table 1, the mean age was 45 (27 - 57) and 39 (25, 58) ( $p=0.067$ ), for the test and control groups, respectively. Eight in each group were females ( $p=0.746$ ). Most of them were non-smokers nor alcohol addicted. No systemic disease was reported by any patient. The main reason for tooth extraction was extensive caries. Implants mainly rehabilitated the first and second upper premolars. Except for 3 cases in the test group in which the implant rotated at the time of impressions, all other cases were restored according to the protocol. Two implants, 1 in each group, showed signs of pain upon mastication after the 3 months follow-up and were removed, as they were mobile. No other implant was lost after 1 year. On average, 29.67 (3.53) vs. 59.38 (4.73) days went from implant placement to impressions and 45.07 (3.47) vs. 73.63 (8.14) from implant placement to loading in the test and control groups, respectively.

**Table 1:** Description and comparison of clinical variables.

		Test group (dental impressions 4 weeks after implant placement) n=18 (52.94%)	Control group (dental impressions 8 weeks after implant placement) n=16 (47.06%)	p value*						
Age [mean (min, max)] (years)		42 (25, 58)								
		45 (27 - 57)	39 (25 - 58)	0.067						
Gender [n (%)]	Female	8 (44.4)	8 (50.0)	0.746						
	Male	10 (55.6)	8 (50.0)							
Smoking [n (%)]	No	14 (77.8)	11 (68.8)	0.302						
	Low (<5 cigarettes/day)	4 (22.2)	3 (18.8)							
	Low (>5, <10 cigarettes/day)	0 (0.0)	2 (12.5)							
Mesio-distal distance [mean (SD)] (mm)		9.0 (2.22)	8.5 (1.45)	0.527						
Occlusal height [mean (SD)] (mm)		6.82 (1.19)	7.06 (1.78)	0.645						
Bucco-lingual width [mean (SD)] (mm)										
Before flap raising		7.22 (1.35)	7.31 (2.12)	0.888						
Implant diameter [n (%)]	After flap raising	6.83 (1.72)	7.03 (1.51)	0.736						
	3.75 mm	10 (55.6)	11 (68.8)	0.429						
	4.20 mm	8 (44.4)	5 (31.2)							
Implant length [n (%)]	10.0 mm	9 (50.0)	8 (50.0)	1						
	11.5 mm	9 (50.0)	8 (50.0)							
Days from implant placement to impressions [mean (SD)]		29.67 (3.53)	59.38 (4.73)	<0.001 *						
Days from implant placement to prosthesis delivery [mean (SD)]		45.07 (3.47)	73.63 (8.14)	<0.001 *						
Abutment height [n (%)]	1.50 mm	13 (86.7)	8 (50.0)	0.029 *						
	3.00 mm	2 (13.3)	8 (50.0)							
Tissue thickness [mean (SD)] (mm)										
Implant placement		2.72 (1.07)	2.78 (0.84)	0.911						
Impressions		2.30 (0.46)	2.78 (0.66)	0.012 *						
Width of keratinized tissue [mean (SD)] (mm)										
Implant placement		3.53 (1.66)	4.38 (1.02)	0.034 *						
Prosthesis delivery		2.87 (1.36)	3.75 (1.39)	0.067						
1 week post-loading		2.92 (1.71)	3.63 (1.36)	0.235						
1 month post-loading		2.93 (1.58)	3.70 (1.33)	0.163						
3 months post-loading		3.07 (1.73)	3.43 (1.09)	0.509						
6 months post-loading		3.54 (1.33)	3.50 (0.85)	0.860						
12 months post-loading		3.66 (1.15)	3.54 (0.78)	0.798						
Papilla index [% within visit] (MESIAL) **	0	1	2	3	0	1	2	3		
	Prosthesis delivery	13.3	73.3	13.3	0.0	6.2	62.5	31.2	0.0	0.441
	1 week post-loading	7.7	30.8	46.2	15.4	0.0	6.2	87.5	6.2	0.107
	1 month post-loading	0.0	20.0	60.0	20.0	0.0	0.0	86.7	13.3	0.140
	3 months post-loading	0.0	7.1	35.7	57.1	0.0	21.4	28.6	50.0	0.555
	6 months post-loading	0.0	0.0	7.7	92.3	0.0	7.1	28.6	64.3	0.202
	12 months post-loading	0.0	0.0	25.0	75.0	0.0	0.0	30.8	69.2	0.748
Papilla index [% within visit] (DISTAL) **	0	1	2	3	0	1	2	3		
	Prosthesis delivery	13.3	66.7	20.0	0.0	6.2	56.2	37.5	0.0	0.508
	1 week post-loading	0.0	30.8	53.8	15.4	0.0	12.5	81.2	6.2	0.284
	1 month post-loading	0.0	20.0	60.0	20.0	0.0	0.0	93.3	6.7	0.079
	3 months post-loading	0.0	7.1	42.9	50.0	0.0	14.3	28.6	57.1	0.670
	6 months post-loading	0.0	0.0	30.8	69.2	0.0	0.0	42.9	57.1	0.516
	12 months post-loading	0.0	0.0	8.3	91.7	0.0	0.0	23.1	76.9	0.315

\* p value: Wilcoxon rank sum test for continuous variables and chi-squared test for categorical variables; \*\*: There were no cases with papilla index higher than 3.

Regarding the radiographic measurements (Table 2), no differences were found for the distance between the implant and each adjacent tooth, the bone level at the adjacent teeth and the distance from the contact point to the bone crest at any visit. Within each group, the MBL from implant placement to prosthesis delivery that corresponds to post-surgical remodeling was significantly different; 0.42 (0.30) vs. -0.04 (0.42) mm for the test group ( $p<0.001$ ) and 0.46 (0.31) vs. 0.12 (0.31) mm for the control group ( $p<0.001$ ). These differences between the groups were not statistically significant. The average MBL change from implant placement to loading was -0.48 (0.51) vs. -0.31 (0.38) mm for the test and control group, respectively; the difference was not statistically significant ( $p=0.312$ ). No other significant change was observed from prosthesis delivery to the 1-year follow-up either within or between the groups (Figure 2).



**Figure 2:** Representation of the distal and mesial average of implant MBL over time.

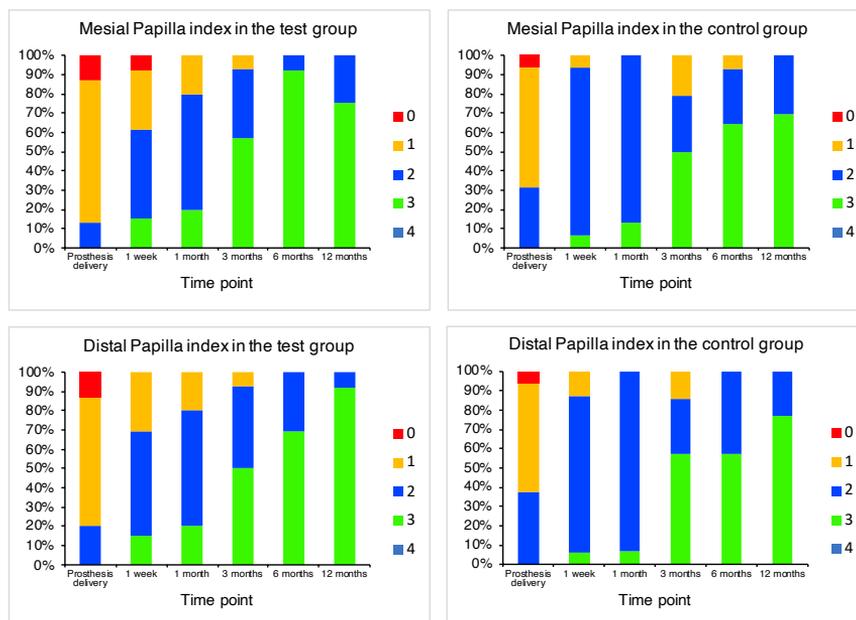
**Table 2:** Description and comparison of radiographical variables (mean (SD) in mm except the crown-to-implant ratio).

	Test group (dental impressions 4 weeks after implant placement)	Control group (dental impressions 8 weeks after implant placement)	p value*
<b>Distance from implant to anterior tooth</b>	2.83 (1.09)	2.18 (1.00)	0.143
<b>Distance from implant to posterior tooth</b>	2.67 (1.19)	2.37 (1.00)	0.576
<b>Crown length</b>	9.36 (0.78)	8.41 (1.26)	0.015 *
<b>Crown-to-implant Ratio</b>	1.03 (0.07)	1.00 (0.15)	0.423
<b>Implant MBL (MESIAL)</b>			
Implant placement	0.53 (0.45)	0.54 (0.35)	0.602
Prosthesis delivery	0.01 (0.56)	0.13 (0.45)	0.678
3 months post-loading	-0.16 (0.63)	0.10 (0.17)	0.618
6 months post-loading	0.01 (0.23)	-0.08 (0.39)	0.592
12 months post-loading	-0.02 (0.29)	-0.21 (0.49)	0.175
<b>Anterior Tooth MBL</b>			
Implant placement	2.63 (0.77)	2.27 (0.68)	0.143
Prosthesis delivery	2.77 (0.70)	2.38 (0.58)	0.120
3 months post-loading	2.79 (0.82)	2.31 (0.68)	0.237
6 months post-loading	2.39 (0.58)	2.69 (0.45)	0.306
12 months post-loading	2.70 (0.60)	2.76 (0.28)	0.854
<b>Implant MBL (DISTAL)</b>			
3 months post-loading	-0.25 (0.45)	0.05 (0.24)	0.109
6 months post-loading	-0.24 (0.45)	-0.20 (0.33)	0.771
12 months post-loading	-0.28 (0.43)	-0.23 (0.29)	0.773
<b>Posterior Tooth MBL</b>			
Implant placement	2.01 (0.85)	1.98 (1.08)	0.860
Prosthesis delivery	2.06 (0.85)	2.07 (1.27)	0.567
3 months post-loading	1.95 (0.59)	1.91 (0.95)	0.473
6 months post-loading	2.08 (1.02)	1.92 (0.91)	0.687
12 months post-loading	2.10 (0.93)	1.92 (0.86)	0.478
<b>Average Implant MBL</b>			
Implant placement	0.42 (0.30)	0.46 (0.31)	0.571
Prosthesis delivery	-0.04 (0.42)	0.12 (0.31)	0.507
3 months post-loading	-0.20 (0.49)	0.07 (0.17)	0.129
6 months post-loading	-0.11 (0.30)	-0.14 (0.33)	0.645
12 months post-loading	-0.15 (0.32)	-0.22 (0.37)	0.443
<b>MBL change from Implant placement to Loading</b>			
Mesial	-0.55 (0.70)	-0.38 (0.55)	0.841
Distal	-0.43 (0.40)	-0.25 (0.25)	0.349
Average	-0.48 (0.51)	-0.31 (0.38)	0.312
<b>MBL change from Loading to 1 year</b>			
Mesial	-0.24 (0.33)	-0.34 (0.25)	0.196
Distal	-0.23 (0.18)	-0.33 (0.29)	0.902
Average	-0.23 (0.23)	-0.33 (0.21)	0.261

\* p value: Wilcoxon rank sum test

The main finding of the study was that the average MBL change from loading to the 1-year follow-up was  $-0.23$  (0.23) vs.  $-0.33$  (0.21) mm for the test and control groups, respectively; the difference was not statistically significant ( $p=0.261$ ). Particularly, at the 1-year follow-up the differences in MBL between the test and control groups were not significant on neither the mesial side ( $-0.02$  (0.29) vs.  $-0.21$  (0.49) mm;  $p=0.175$ ), the distal ( $-0.28$  (0.43) vs.  $-0.23$  (0.29);  $p=0.773$ ) or average ( $-0.15$  (0.32) vs.  $-0.22$  (0.37);  $p=0.443$ ). None of the clinical or radiological variables evaluated had a determinant influence on the MBL at any visit or group. This means that there were no significant changes from loading to 1 year either within or between the groups.

At implant placement, tissue thickness was similar for both groups, 2.72 (1.07) vs. 2.78 (0.84) mm for the test and control groups, respectively ( $p=0.911$ ); width of keratinized tissue was significantly wider for the control group, 3.53 (1.66) vs. 4.38 (1.02) mm for the test and control groups, respectively ( $p=0.034$ ). Afterwards, no significant differences were detected in the width of keratinized tissue up to 1 year. Interestingly, tissue thickness at the time of impressions was lower in the test group, 2.30 (0.46) vs. 2.78 (0.66) mm for the test and control groups, respectively;  $p=0.012$ ); this determined the height of the Ti-Base transmucosal abutment. As a consequence, there were significant differences of the Ti-Base abutment height, shorter in the test group: 86.7% vs. 50% of 1.50 mm in the test and control groups, respectively;  $p=0.029$ ). The opposite happened to the length of the crowns, longer for the test group, 9.36 (0.78) vs. 8.41 (1.26) mm for the test and control groups, respectively;  $p=0.015$ ); however, the crown-to-implant ratios did not differ, 1.03 (0.07) vs. 1.00 (0.15) for the test and control groups, respectively;  $p=0.423$ ). No other clinical parameter showed statistically significant differences between the groups, including the mesio-distal distance, occlusal height and healing index. Papilla index was not different between groups at any follow-up visit either (Figure 3).



**Figure 3:** Mesial and distal papilla index for each group and time point.

Signs of mucositis were recorded for 2 patients in the control group and 1 in the test showed at the 3- and 6-month follow-up, respectively. Irrigation with chlorhexidine and hygiene instructions resolved the condition.

## DISCUSSION

The aim of this study was to compare the MBL around implants with a thin multi-phosphonate coated surface after either an early or conventional loading protocol; this is, on which the prosthetic phase was initiated either 4 or 8 weeks after implant placement by taking the impressions. The crowns were placed 2 weeks later, when occlusal loading actually started. Marginal bone loss was compared between both groups at several times with the final milestone of 1-year after delivery of the final prosthesis. Our general results showed that an early loading protocol initiated 4 weeks after placing implants with a multi-phosphonate coated surface did not affect the MBL when compared to loading initiated after 8 weeks, for any milestone until 1 year after prosthesis delivery.

Comparing our main outcomes with the available literature is challenging, due to the different criteria established to categorize the loading times. The most updated definition of “early loading” refers to an implant with prosthesis in occlusion with the opposing dentition between 1 week and 2 months after implant placement (Morton et al. 2018), which is in fact a wide time frame. A fundamental factor that differentiates between immediate and early loading is based on the biomechanical and biological significance of the concept of primary stability, and that of secondary stability. Secondary stability, achieved by osseointegration, which is a dynamic concept, is what finally ensures the stability and long-term success of the implant (Raghavendra et al. 2005). In the interim time between primary stability (mechanical) and secondary stability (biological), there is a critical moment when the implant is in a compromised phase that ranges from 1 to 4 weeks (Raghavendra et al. 2005). Thus, although the definition of early loading goes from 1 to 8 weeks (Morton et al. 2018), the time between 1 and 4 weeks is actually the period when more changes occur, and the implant is less stable. Thus, we have to be careful when analyzing the literature in this regard.

In some studies, the implant loading is done quite early. For instance, in 27 patients, to restore mandibular molars, Salvi and coworkers compared implants loaded at two weeks (test) versus 6 weeks (control) after implant placement with cemented single-tooth crowns. Two test and one control implants rotated at the time of abutment connection (one week [test] and 5 weeks [control] after implant placement). No statistical differences were found in mean crestal bone loss measurements ( $0.57\pm 0.49$  vs.  $0.72\pm 0.50$  mm) (Salvi et al. 2004). Although this study is similar to the current one in many aspects, it is important to note that the implants in Salvi's study test group had their prosthetic abutments connected only a week after surgery, and posteriorly, one week later, the crowns were cemented. Some other differences with our protocol are that 1.- these implants were placed in mandibular bone, therefore, denser, in contrast to our study in which most of the implants were placed in the maxilla; 2.- primary stability after a week of bone healing is still well-maintained while bone remodeling is still not at full activity; and, finally, 3.- these implants were never subjected to anti-torque force, for example in the impression phase, because crowns were cemented; while in our protocol we had multiple screw-in and screw-out episodes (removing the

healing abutment to screw-in the impression coping, and back to screw-in the healing abutment again). Thus, it could be said that, in our case, implants were subjected to higher mechanical demands with the most potentially deleterious movement at the time of transition from primary to secondary stability.

With a more similar timeframe to our study, Grandi and coworkers compared the clinical outcomes of single implants with immediate non-occlusal loading, early non-occlusal loading at 3 weeks, or conventionally loaded at 4 months. There were no statistically significant differences for any of the outcome measures up to 1-year post-loading (Grandi et al. 2015). In terms of complications, our study also shows similar outcomes as in Grandi's study two implants failed, one in the immediately loaded and one in the early loaded group ( $p=0.601$ ). Bornstein and coworkers with an early loading protocol after 3 weeks of healing of implants placed in the mandible also found similar outcomes but in a shorter follow-up, only 6 months (Bornstein et al. 2009). Some of their implants, as in Salvi's study, were considered "spinner", and left unloaded for a longer period of time. In our study, when this occurred, it was decided to exclude those implants from further analysis. Thus, survival rates may vary, but this circumstance has to be considered.

In contrast, other protocols established early loading protocols after 6 weeks of bone healing. In this case, using implants with an internal conical connection, Mitsias and coworkers (2018) found similar outcomes to those reported in this study: peri-implant marginal bone loss was  $0.19\pm 0.44$  mm at immediately loaded implants (2 days),  $0.18\pm 0.66$  mm at early loaded implants (6 weeks) and  $0.25\pm 0.28$  mm at conventionally loaded implants (3 months). There were no statistically significant differences in complications ( $p=1.000$ ) and bone loss ( $p=0.806$ ) between the three loading strategies (Mitsias et al. 2018). Similarly, a series of studies led by our group using the same early loading protocol found similar results in terms of survival and MBL, in short (Galindo-Moreno et al. 2012), medium (Maiorana et al. 2015) and long-term follow-ups (Galindo-Moreno et al. 2017a). Many other protocols using different implant surfaces and clinical restorations have also demonstrated clinical effectiveness and no differences in terms of bone maintenance and clinical success in comparison with delayed protocols (Kim et al. 2016; Makowiecki et al. 2017; Han et al. 2018). This happens, in our opinion, because bone healing is completed for functional loading after 6 weeks (Berglundh et al. 2003); so, all these protocols, longer than 6 weeks, are totally reliable from a biological and clinical point of view, although they might be influenced by several factors such as specific bony substratum, implant surface, or dimension of the gap between the bone and the implant.

We have not found any differences in terms of other clinical variables. It should be noted that we used a single-stage protocol to reduce time for actual loading and to avoid damaging the bone on the adjacent teeth, which highly influences the bone around the implant (Galindo-Moreno et al. 2017b). In our study, marginal bone levels on adjacent teeth did not change significantly over time. Also related to this, the papilla index evaluated over time, clearly improved from loading to the 1-year follow-up, as the interproximal papilla mainly depends on the adjacent natural teeth (Rocuzzo et al. 2018). In our sample, this happened regardless of the inclusion of some smoker patients. We did not exclude these patients from our demanding loading protocol because previous clinical studies using the same surface used in the current study indicated that smokers were actually more benefited from having this implant surface

than other (Esposito et al. 2013). A possible explanation for this might be that smoker patients might have their healing potential impaired. Thus, using an implant surface that stimulates bone healing, would benefit them specifically.

In our study, we have not found influence of any other variable on MBL, including the thickness of the peri-implant mucosa or the height of the transgingival Ti-base abutment. As mentioned, in our study, more 1.5 mm Ti-base abutments were used in the test group because the thickness of the tissue was lower at the time of impressions. This could be due to a lower maturation of the tissues after such short time, although our sample size is too small to support any conclusion in this sense. In any case, we have to keep in mind that several recent studies are highlighting that the effect of the thickness of the mucosa on MBL becomes irrelevant when the height of the transgingival abutment is high (Pico et al. 2019; Spinato et al. 2019). Our previous studies on this topic also refer to a cut-point of 2 mm of minimum transgingival abutment to prevent MBL (Galindo-Moreno et al. 2014). Finally, and maybe most importantly, we have to remember that not all transmucosal abutments behave in the same way, in terms of sealing the gap, being mechanically stable or allowing to separate the gap between the prosthesis and the implant far from the bone (Piattelli et al. 2003; Tallarico et al. 2018). In the current study we used metal-ceramic crowns screwed over the implant. The crowns were cemented in the laboratory over a Ti-Base abutment in order to minimize the interface between the crown and the abutment. In contrast, the referenced studies used transmucosal abutments for multiple crowns in which the gap between the prosthesis and the abutment could be bigger, as this gap is not sealed extraorally. Thus, abutment height becomes particularly relevant in those situations but not so much in single-unit rehabilitations as those used in the current study.

Our study protocol was designed to be framed in the early loading range, with some important factors to be considered:

- 1.- The drilling protocol was not modified by bone availability, and mechanical retention did not become a capital factor, as it is in immediate loading or very early loading protocols. So, we did not impose a minimum insertion torque as a criterion for inclusion or exclusion, unlike other studies already referenced (Salvi et al. 2004; Grandi et al. 2015; Mitsias et al. 2018).
- 2.- The early loading concept (1 to 8 weeks after placement) actually encompass the entire bone healing process around implants (Raghavendra et al. 2005), although the healed and functional bone will continue to remodel far beyond this time frame. However, we still subject our patients to long waiting times. We even defer loading processes for 6 months. This should only be used, in our opinion, in cases of concomitant bone regeneration, not so much because of the osteointegration of the implant but because of the maturation of the graft.
- 3.- Finally, the use of modified surfaces, as the one used in the current study, to shorten the healing processes is recommended, although the definitive waiting time, as discussed above, cannot be clearly established. In this sense, there are implants available on the market with long-term studies on clinical success that were rehabilitated after relatively short times for osseointegration (Marković et al. 2015; Galindo-Moreno et al. 2017a). As consequence, this should invite us to shorten our daily clinical protocols.

The main limitation of the study is the sample size, particularly important to make within groups comparisons of the influence of other variables on the main outcome variable, MBL. Although no differences were found, which could be due to such limitation if they truly exist, our study is quite larger than all of the previous studies on similar topics. In fact, it is larger than the only previous report using the same coating treatment but different implant macrodesign and prosthetic connection. The novelty of our study in terms of loading protocol also has to be considered. Although most of our patients were younger than 50 and one would tend to think that young patients heal faster, this does not necessarily have to be the case. In addition, as discussed, we also have to keep in mind the time frame and the number of implants that did not support rotating forces at 4 weeks, which is approximately the most critical time. Thus, the patient must be properly informed of this potential complication when this kind of protocol is performed. Moreover, the follow-up period might be considered short-term for the analysis of MBL, but we must also note that recent studies on this have been published with even shorter terms and, still more, our group has reported that early bone loss can be used as a predictor of future bone loss (Galindo-Moreno et al. 2015). Thus, one-year follow-up can be considered a short but adequate frame for the purpose of MBL analysis. In any case, the pilot nature of this study should serve to provide sufficient data for future studies on the particular surface and loading protocols evaluated in the current analysis.

## **CONCLUSIONS**

Within the mentioned limitations of this pilot study, it can be concluded that the marginal bone levels around implants with a modified surface based on a permanently adhering multiphosphonate coating are not affected up to 1 year of follow-up by a loading protocol initiated 4 or 8 weeks after implant placement. Moreover, no other clinical or radiographical variable has shown any influence on the final outcomes.

## **COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS**

### **Funding**

This study has been completely covered by the Research Cathedra MIS Implants Technologies-University of Granada, sponsored by MIS Implants Technologies. The company has not influenced the reporting of the outcomes in any way.

The authors of the study are also partially supported by Research Group #CTS-1028 (Junta de Andalucía, Spain).

### **Conflict of Interest**

Pablo Galindo-Moreno lectures regularly for MIS Implants Technologies, among other companies, although there is no commercial interest or royalties on any products mentioned in this manuscript. The other authors declare no conflict of interest.

### **Ethical aspects**

This prospective controlled randomized clinical trial was approved by the Ethical Committee for Research in Humans of the University of Granada, Spain (216/CEIH/2016). Moreover, this study was registered in [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) with the protocol number NCT03059108. It was conducted in patients referred to the Oral Surgery and Implant Dentistry Clinic of the School of Dentistry, University of

Granada, Spain. The protocol was developed in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association, the Clinical Research Guide to Medical Devices for Humans (ISO 14155:2011) and the General Guide to Good Clinical Practices (2001/20/EC).

### Acknowledgments

Preliminary findings of the current study were presented at the 28th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration (Padial-Molina et al. 2019).

### REFERENCES

- Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P. & Lindhe, J. (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants: A model study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 14: 251–262.
- Bornstein, M.M., Hart, C.N., Halbritter, S.A., Morton, D. & Buser, D. (2009) Early loading of nonsubmerged titanium implants with a chemically modified sand-blasted and acid-etched surface: 6-month results of a prospective case series study in the posterior mandible focusing on peri-implant crestal bone changes and implant stability quotient (ISQ) values. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 11: 338–347.
- Cirera, A., Sevilla, P., Manzanares, M.C., Franch, J., Galindo-Moreno, P. & Gil, J. (2020) Osseointegration around dental implants biofunctionalized with TGF $\beta$ -1 inhibitor peptides: an in vivo study in Beagle dogs. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 31: 62.
- Cochran, D.L., Morton, D. & Weber, H.-P. (2004) Consensus statements and recommended clinical procedures regarding loading protocols for endosseous dental implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 19 Suppl: 109–13.
- Davies, J.E. (2003) Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of dental education* 67: 932–49.
- Ellingsen, J.E., Johansson, C.B., Wennerberg, A. & Holmén, A. (2004) Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 19: 659–66.
- Espósito, M., Dojcinovic, I., Germon, L., Lévy, N., Curno, R., Buchini, S., Péchy, P. & Aronsson, B.O. (2013) Safety and efficacy of a biomimetic monolayer of permanently bound multi-phosphonic acid molecules on dental implants: 1 year post-loading results from a pilot quadruple-blinded randomised controlled trial. *European Journal of Oral Implantology* 6: 227–236.
- Galindo-Moreno, P., León-Cano, A., Ortega-Oller, I., Monje, A., O'valle, F. & Catena, A. (2015) Marginal bone loss as success criterion in implant dentistry: Beyond 2 mm. *Clinical Oral Implants Research* 26: e28–e34.
- Galindo-Moreno, P., León-Cano, A., Ortega-Oller, I., Monje, A., Suárez, F., ÓValle, F., Spinato, S. & Catena, A. (2014) Prosthetic Abutment Height is a Key Factor in Peri-implant Marginal Bone Loss. *Journal of Dental Research* 93: 80S–85S.
- Galindo-Moreno, P., Nilsson, P., King, P., Becktor, J., Speroni, S., Schramm, A. & Maiorana, C. (2012) Clinical and radiographic evaluation of early loaded narrow diameter implants - 1-year follow-up. *Clinical oral implants research* 23: 609–16.
- Galindo-Moreno, P., Nilsson, P., King, P., Worsaae, N., Schramm, A., Padial-Molina, M. & Maiorana, C. (2017a) Clinical and radiographic evaluation of early loaded narrow-diameter

implants: 5-year follow-up of a multicenter prospective clinical study. *Clinical Oral Implants Research* 28: 1584–1591.

Galindo-Moreno, P., Padiál-Molina, M., Nilsson, P., King, P., Worsaae, N., Schramm, A. & Maiorana, C. (2017b) The influence of the distance between narrow implants and the adjacent teeth on marginal bone levels. *Clinical Oral Implants Research* 28: 704–712.

Galindo Moreno, P., Avila Ortiz, G., Wang, H., Padiál Molina, M., Ortega Oller, I. & O'Valle, F. (2016) The role of melatonin in periodontal and periimplant bone homeostasis and regeneration. *Journal of Oral Science & Rehabilitation* 2: 8–15.

Ghimire, S., Miramini, S., Richardson, M., Mendis, P. & Zhang, L. (2018) Role of Dynamic Loading on Early Stage of Bone Fracture Healing. *Annals of biomedical engineering* 46: 1768–1784.

Grandi, T., Guazzi, P., Samarani, R., Tohme, H., Khoury, S., Sbricoli, L., Grandi, G. & Esposito, M. (2015) Immediate, early (3 weeks) and conventional loading (4 months) of single implants: Preliminary data at 1 year after loading from a pragmatic multicenter randomised controlled trial. *European Journal of Oral Implantology* 8: 115–126.

Han, J., Tang, Z., Zhang, X. & Meng, H. (2018) A prospective, multi-center study assessing early loading with short implants in posterior regions. A 3-year post-loading follow-up study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 20: 34–42.

Herrero-Climent, M., Lopez-Jarana, P., Lemos, B.F., Gil, F.J., Falcao, C., Rios-Santos, J. V & Rios-Carrasco, B. (2020) Relevant Design Aspects to Improve the Stability of Titanium Dental Implants. *Materials (Basel, Switzerland)* 13:.

Jemt, T. (1997) Regeneration of gingival papillae after single-implant treatment. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 17: 326–33.

Kim, S.B., Yun, P.Y., Kim, S.Y., Yi, Y.J., Kim, J.Y. & Kim, Y.K. (2016) Prospective randomized clinical trial of hydrophilic tapered implant placement at maxillary posterior area: 6 weeks and 12 weeks loading. *Journal of Advanced Prosthodontics* 8: 396–403.

Maiorana, C., King, P., Quaas, S., Sondell, K., Worsaae, N. & Galindo-Moreno, P. (2015) Clinical and radiographic evaluation of early loaded narrow-diameter implants: 3 years follow-up. *Clinical Oral Implants Research* 26: 77–82.

Makowiecki, A., Botzenhart, U., Seeliger, J., Heinemann, F., Biocev, P. & Dominiak, M. (2017) A comparative study of the effectiveness of early and delayed loading of short tissue-level dental implants with hydrophilic surfaces placed in the posterior section of the mandible—A preliminary study. *Annals of Anatomy* 212: 61–68.

Marković, A., Čolić, S., Šćepanović, M., Mišić, T., Dinić, A. & Bhusal, D.S. (2015) A 1-Year Prospective Clinical and Radiographic Study of Early-Loaded Bone Level Implants in the Posterior Maxilla. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 17: 1004–1013.

Mitsias, M., Siormpas, K., Pistilli, V., Trullenque-Eriksson, A. & Esposito, M. (2018) Immediate, early (6 weeks) and delayed loading (3 months) of single, partial and full fixed implant supported prostheses: 1-year post-loading data from a multicentre randomised controlled trial. *European Journal of Oral Implantology* 11: 63–75.

Morelli, T., Neiva, R., Nevins, M.L., McGuire, M.K., Scheyer, E.T., Oh, T.J., Braun, T.M., Nör, J.E., Bates, D. & Giannobile, W. V. (2011) Angiogenic biomarkers and healing of living cellular constructs. In: *Journal of Dental Research*. pp. 456–462.

Morton, D., Gallucci, G., Lin, W.-S., Pjetursson, B., Polido, W., Roehling, S., Sailer, I., Aghaloo, T., Albera, H., Bohner, L., Braut, V., Buser, D., Chen, S., Dawson, A., Eckert, S.,

Gahlert, M., Hamilton, A., Jaffin, R., Jarry, C., Karayazgan, B., Laine, J., Martin, W., Rahman, L., Schlegel, A., Shiota, M., Stilwell, C., Vorster, C., Zembic, A. & Zhou, W. (2018) Group 2 ITI Consensus Report: Prosthodontics and implant dentistry. *Clinical oral implants research* 29 Suppl 16: 215–223.

Padial-Molina, M., Galindo-Moreno, P. & Avila-Ortiz, G. (2009) Biomimetic ceramics in implant dentistry. *Minerva Biotechnologica* 21: 173–186.

Padial-Molina, M., Galindo-Moreno, P., Fernández-Barbero, J.E., O'Valle, F., Jódar-Reyes, A.B., Ortega-Vinuesa, J.L. & Ramón-Torregrosa, P.J. (2011) Role of wettability and nanoroughness on interactions between osteoblast and modified silicon surfaces. *Acta Biomaterialia* 7: 771–778.

Padial-Molina, M., Gutierrez-Garrido, L., Lopez-Chaichio, L., Rodriguez-Alvarez, R., Guerra-Lorenzo, C., Lauritano, F. & Galindo-Moreno, P. (2019) Early loading after 4 weeks of C1 implants with a B+ treated surface-effect on marginal bone level. *Clinical Oral Implants Research* 30: 290–290.

Piattelli, A., Vrespa, G., Petrone, G., Iezzi, G., Annibali, S. & Scarano, A. (2003) Role of the Microgap Between Implant and Abutment: A Retrospective Histologic Evaluation in Monkeys. *Journal of Periodontology* 74: 346–352.

Pico, A., Martín-Lancharro, P., Caneiro, L., Nóvoa, L., Batalla, P. & Blanco, J. (2019) Influence of abutment height and implant depth position on interproximal peri-implant bone in sites with thin mucosa: A 1-year randomized clinical trial. *Clinical oral implants research* 30: 595–602.

Raghavendra, S., Wood, M.C. & Taylor, T.D. (2005) Early wound healing around endosseous implants: a review of the literature. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 20: 425–31.

Rocuzzo, M., Rocuzzo, A. & Ramanuskaite, A. (2018) Papilla height in relation to the distance between bone crest and interproximal contact point at single-tooth implants: A systematic review. *Clinical Oral Implants Research* 29: 50–61.

Rupérez, E., Manero, J.M., Bravo-González, L.A., Espinar, E. & Gil, F.J. (2016) Development of biomimetic NiTi alloy: Influence of thermo-chemical treatment on the physical, mechanical and biological behavior. *Materials* 9:.

Saghaei, M. (2011) An overview of randomization and minimization programs for randomized clinical trials. *Journal of Medical Signals and Sensors* 1: 55–61.

von Salis-Soglio, M., Stübinger, S., Sidler, M., Klein, K., Ferguson, S., Kämpf, K., Zlinszky, K., Buchini, S., Curno, R., Péchy, P., Aronsson, B.-O. & von Rechenberg, B. (2014) A Novel Multi-Phosphonate Surface Treatment of Titanium Dental Implants: A Study in Sheep. *Journal of Functional Biomaterials* 5: 135–157.

von Salis, M., von Rechenberg, B., Ferguson, S., Buchini, S., Curno, R., Pechy, P. & Aronsson, B.-O. (2012) SurfLink® Dental Implant: A Novel Implant Surface for Accelerated and Improved Bone Healing. *European Cells and Materials* 23: 6.

Salvi, G.E., Gallini, G. & Lang, N.P. (2004) Early loading (2 or 6 weeks) of sandblasted and acid-etched (SLA) ITI® implants in the posterior mandible. A 1-year randomized controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* 15: 142–149.

Sevilla, P., Cirera, A., Dotor, J., Gil, F.J., Galindo-Moreno, P. & Aparicio, C. (2018) In vitro cell response on CP-Ti surfaces functionalized with TGF-β1 inhibitory peptides. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 29:.

Spinato, S., Stacchi, C., Lombardi, T., Bernardello, F., Messina, M. & Zaffe, D. (2019) Biological width establishment around dental implants is influenced by abutment height irrespective of vertical mucosal thickness: A cluster randomized controlled trial. *Clinical Oral Implants Research* 30: 649–659.

Szmukler-Moncler, S., Piattelli, A., Favero, G.A. & Dubruille, J.H. (2000) Considerations preliminary to the application of early and immediate loading protocols in dental implantology. *Clinical oral implants research* 11: 12–25.

Tallarico, M., Fiorellini, J., Nakajima, Y., Omori, Y., Takahisa, I. & Canullo, L. (2018) Mechanical outcomes, microleakage, and marginal accuracy at the implant-abutment interface of original versus nonoriginal implant abutments: A systematic review of in vitro studies. *BioMed Research International* 2018:.

Viornerly, C., Chevolut, Y., Léonard, D., Aronsson, B.O., Péchy, P., Mathieu, H.J., Descouts, P. & Grätzel, M. (2002a) Surface modification of titanium with phosphonic acid to improve bone bonding: Characterization by XPS and ToF-SIMS. *Langmuir* 18: 2582–2589.

Viornerly, C., Guenther, H.L., Aronsson, B.O., Péchy, P., Descouts, P. & Grätzel, M. (2002b) Osteoblast culture on polished titanium disks modified with phosphonic acids. *Journal of Biomedical Materials Research* 62: 149–155.

