



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS**

**EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA OSEOINTEGRACIÓN DE IMPLANTES
DENTALES MODIFICADOS CON RECUBRIMIENTOS BIOACTIVOS
NANOESTRUCTURADOS, USANDO UN MODELO DE RATA.**

Matías Eugenio Mattmann Soto

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Alfredo Von Marttens Castro

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 11100495
Santiago - Chile
2013**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS**

**EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA OSEOINTEGRACIÓN DE IMPLANTES
DENTALES MODIFICADOS CON RECUBRIMIENTOS BIOACTIVOS
NANOESTRUCTURADOS, USANDO UN MODELO DE RATA.**

Matías Eugenio Mattmann Soto

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Alfredo Von Marttens Castro

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 11100495
Santiago - Chile
2013**

A mi familia, especialmente a mi mamá y a mi abuela, que sé que mira con orgullo este gran paso que estoy dando.

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, por el apoyo y el empuje que me han dado durante todos estos años para terminar este proceso tan importante para mí.

Al Prof. Dr. Cristian Covarrubias, que me orientó y ayudó constantemente en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Dr. Alfredo Von Marttens, Dr. Pablo Caviedes, Dr. Cristián Arriagada y Guillermo Elorza, por su ayuda en el desarrollo de los experimentos de esta tesis.

Al Proyecto FONDECYT 11100495, por el financiamiento otorgado para este trabajo.

A los funcionarios y docentes que conocí, y que fueron un real aporte para mi formación como profesional.

A mis amigos y amigas, que fui conociendo durante estos años de universidad, que aunque pasamos por muchas penurias y alegrías, nos iremos con la satisfacción del trabajo cumplido y con algo más, la amistad.

Un agradecimiento especial para la gente que me puso las cosas difíciles y me hizo pasar malos ratos, ya que gracias a ellos desarrollé el temple y coraje que me ayudarán en el futuro como profesional y como persona.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
MARCO TEÓRICO	8
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXOS.....	61

RESUMEN

Introducción

Estudios previos *in vitro* y utilizando láminas de titanio como superficie modelo, han demostrado que recubrimientos con una estructura nanoporosa ordenada y cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo ó hidroxiapatita; mejoran propiedades de oseointegración tales como: la inducción de la mineralización de hidroxiapatita, adhesión, proliferación y actividad osteogénica de células madres/osteoblásticas. De este modo, se espera conocer la respuesta *in vivo* de estos recubrimientos y utilizando implantes dentales de uso clínico.

Objetivo

Evaluar el efecto de recubrimientos bioactivos nanoporosos en la oseointegración de implantes de titanio, usando un modelo animal *in vivo* en rata.

Materiales y métodos

1. Preparación de soles

Se prepararon dos tipos de soluciones “sol-gel” para ser utilizados como recubrimientos nanoestructurados de sílice, uno de ellos está cargado con nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) y el otro con nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG).

Las nanopartículas de nHA y nBG a utilizar en este trabajo fueron sintetizadas en una etapa anterior de este proyecto, cuyo procedimiento aparece recientemente publicado.

2. Recubrimiento del implante y caracterización

Se prepararon recubrimientos nanoporosos de sílice cargados con nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) ó de vidrio bioactivo (nBG) sobre implantes ortodóncicos; utilizando la técnica Sol-Gel de Autoensamblaje Inducido por Evaporación (EISA) y un procedimiento de “*dip-coating*” a una velocidad controlada de 0,3 mm/s. Los recubrimientos fueron caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) y esterilizados mediante radiación ultravioleta.

3. Implantación in vivo

La implantación *in vivo* se llevó a cabo en 11 ejemplares de ratas de la cepa *Sprague Dawley*, de acuerdo a protocolos aprobados por el comité de bioética institucional. Se implantaron 4 implantes de titanio con recubrimiento de nanopartículas de hidroxiapatita, 4 implantes con recubrimiento de nanopartículas de vidrio bioactivo y 3 implantes control de titanio sin modificar. Finalizado el período de implantación los animales fueron eutanasiados para la extracción de muestras de tejido/implante.

4. Análisis histológico de las muestras

Los tejidos obtenidos fueron procesados y analizados histológicamente mediante microscopía óptica, identificando las zonas de tejido óseo neoformado usando la tinción de azul de toluidina. La interfase hueso-implante y su composición también fue analizada a mayor resolución mediante microscopía electrónica de barrido con retro-dispersión de electrones y análisis elemental (BSE-SEM, EDX).

Resultados y discusión

Se observó que los recubrimientos nanoestructurados promueven el desarrollo de hueso neoformado en la periferia del implante, observándose una mejor respuesta (mayor área de contacto hueso-implante) en el grupo de implantes con el recubrimiento cargado con nBG con respecto a la superficie de titanio no modificada. Además el grado de mineralización del tejido peri-implantar fue superior en el grupo de muestras con recubrimiento, especialmente en las muestras con recubrimiento nBG. Los resultados confirman el efecto de este tipo de nanotopografía porosa y de las nanopartículas de BG en modular la respuesta osteogénica en la superficie del implante.

Conclusión

La utilización de recubrimientos de sílice con nanoestructura porosa cargados con nanopartículas bioactivas de nHA y nBG, mejora el grado de oseointegración *in vivo* de los implantes de titanio, comparado a los implantes no modificados.

INTRODUCCIÓN

El reemplazo de piezas dentarias y tejido óseo con implantes metálicos ha generado una revolución en el campo de la odontología, brindando una opción de tratamiento significativa y previsible para la rehabilitación oral de pacientes desdentados parciales y totales (Ostman, 2008), además de su uso en áreas como la cirugía maxilofacial, prótesis maxilofacial y cirugía ortopédica (Carlsson et al., 2006)

La implantología moderna empezó con el trabajo de Per-Ingvar Brånemark, quien en 1969 realizaba un estudio sobre la segregación de los vasos sanguíneos en el proceso reparativo del callo óseo, para lo cual introdujo cámaras con tornillos de titanio, con el fin de tener una visión directa del proceso. Al realizar este procedimiento, observó que una pieza de titanio integrada en el hueso de un conejo era difícil de remover y estaba firmemente unido a éste (Worthington, 2003). Esto llevó a Brånemark a realizar la caracterización de la formación del tejido óseo interfacial en la superficie de implantes de titanio (Branemark et al., 1969). Posteriormente, los implantes odontológicos basados en los trabajos de Brånemark fueron introducidos en el año 1971 (Branemark et al., 1977; Hobo, 1990).

Los implantes son quirúrgicamente insertados en el tejido óseo y se mantienen en posición por el crecimiento íntimo de hueso en su superficie, fenómeno al cual se refiere como **oseointegración** (Branemark et al., 1969; Branemark et al., 1977). Este término fue descrito por Brånemark, como “la conexión íntima, directa, funcional y mantenida en el tiempo, entre el hueso y un implante sometido o no, a carga”.

El éxito y la durabilidad de un tratamiento implantológico depende considerablemente del grado de oseointegración en la interfase hueso implante. A pesar del alto porcentaje de éxito mostrado en estudios longitudinales, esta opción terapéutica puede presentar diversas complicaciones, de diversa etiología. El fracaso del tratamiento implantológico (aproximadamente de un 5% de los casos),

es muchas veces atribuido a una deficiente formación de tejido óseo en la interfase, como consecuencia de la predominante formación de tejido fibroso. Esta capa de tejido blando, puede acumularse en la superficie de los materiales de los implantes dentales, generando un grado de desajuste que produce micromovilidad y disminuye la integración con el hueso a nivel local, causando inflamación, deterioro en el tejido circundante, y finalmente, la pérdida del implante (Le Guehennec et al., 2007; Stanford CM, 2006; Tomsia AP, 2011).

Los materiales más usados y reconocidos para la fabricación de los implantes, son el titanio y sus aleaciones, ya que este metal es biocompatible, posee muy buenas propiedades mecánicas y de resistencia a la corrosión. Sin embargo, una de las limitaciones que presenta el titanio es su baja capacidad de generar una unión íntima de tipo química con el tejido óseo, lo cual afecta el nivel de oseointegración logrado y por ende, el éxito y la duración del implante. Durante los primeros 10 a 20 años de experiencia en implantología, se aceptaba el concepto de que los implantes de titanio puro y de superficies lisas ayudaban al éxito de la oseointegración. Hoy en día es ampliamente aceptado que la oseointegración de los implantes de titanio depende fuertemente de la topografía (rugosidad, porosidad) y de la composición química de su superficie (Ballarre et al., 2010; Junker et al., 2009; Le Guehennec et al., 2007).

Numerosos estudios han mostrado que la rugosidad superficial de los implantes a una escala de micras (1 a 10 μm) han resultado en un contacto hueso-implante mejorado, pero todavía con un limitado grado de oseointegración (Wennerberg et al., 1998). Esto es atribuido a que la oseointegración es un fenómeno determinado principalmente por procesos biológicos que se llevan a cabo a una escala nanométrica, como la adsorción de proteínas, adhesión celular y señales de diferenciación celular a osteoblastos (Tomsia AP, 2011).

La **nanotecnología** es un campo de las ciencias aplicadas que comprende el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a una escala nanométrica, y la explotación de fenómenos y propiedades de ésta (National

Aeronautics and Space Administration). Esta disciplina, se está utilizando actualmente en la odontología, con el propósito de producir modificaciones topográficas y/o químicas de la superficie de los implantes dentales de titanio, las cuales pueden interactuar de forma distinta con el tejido vivo, en comparación a los materiales tradicionales que se encuentran a una escala micrométrica (Mendonca et al., 2008; Webster et al., 2000b; Zhao et al., 2006).

La respuesta de oseointegración no sólo depende de la micro y nano topografía de la superficie del implante, sino también de sus propiedades químicas. Modificaciones químicas de la superficie del implante también pueden inducir una mejor respuesta del tejido óseo. La incorporación de partículas de materiales con conocidas características bioactivas como la **hidroxiapatita (HA)** y los **vidrios bioactivos (BG)** (Hench, 1991) en las superficies nanoestructuradas; puede estimular el intercambio bioquímico entre la matriz ósea y la superficie del implante de titanio. Este intercambio puede verificarse a través de la mineralización de hidroxiapatita sobre la superficie del implante (Buser et al., 2004).

Las partículas de hidroxiapatita y de vidrio bioactivo han sido utilizadas para mejorar las propiedades de oseointegración de los implantes de titanio, mediante recubrimientos aplicados sobre su superficie. Mediante técnicas experimentales, se puede conseguir la incorporación de estas partículas bioactivas a la matriz del recubrimiento, sin alterar sus propiedades originales (Hamadouche et al., 2001; Zhong and Greenspan, 2000).

Se han realizado experimentos *in vivo*, mediante implantaciones en modelos de rata, donde se observó que los recubrimientos de vidrio bioactivo de tamaño micrométrico favorecen el desarrollo de nuevo tejido óseo en la periferia del implante. Partículas de BG y HA con tamaño nanométrico podrían presentar mejoradas propiedades (Hong Z, 2009; K.P. Sanosh, 2009; Liu et al., 2008). Estudios anteriores han revelado que la confección de biomateriales en un rango nanométrico, produce una biocompatibilidad mejorada (Webster et al., 1999; Webster et al., 2000b; Zhao et al., 2006). Este efecto se debe a que las partículas

con dimensiones nanométricas poseen una mayor área superficial por igual masa de material, lo cual aumenta considerablemente su bioactividad (Ostomel et al., 2006).

El propósito de este trabajo es evaluar las propiedades de oseointegración de implantes odontológicos de titanio que fueron sometidos a un procedimiento de modificación de su superficie mediante recubrimientos nanoestructurados. Trabajos previos realizados en el marco de este mismo proyecto (Inzunza, 2012; Valenzuela et al., 2012) han demostrado que estos recubrimientos mejoran propiedades de oseointegración tales como: la inducción de la mineralización de hidroxiapatita, adsorción de proteínas, adhesión, diferenciación y actividad osteogénica de células madres/osteoblásticas. De esta manera, en el presente trabajo se busca evaluar *in vivo* la respuesta de oseointegración de estos implantes modificados. Adicionalmente este experimento tendría valor científico desde el punto de vista de la implementación de un modelo animal para el estudio de la oseointegración de implantes dentales *in vivo* y de poder aplicar la técnica del recubrimiento sobre la superficie de un implante comercial (con una geometría más compleja que en una lámina de titanio, usada para las pruebas *in vitro*).

La nanotecnología puede ofrecer nuevas oportunidades para crear superficies modificadas de implantes de titanio que mejoren sus propiedades de oseointegración, disminuyendo así las tasas de fracaso y aumentando el éxito clínico de este tipo de tratamientos.

ASPECTOS TEÓRICOS

1. Oseointegración, osteoinducción, osteoconducción y bioactividad

El término oseointegración puede ser definido desde un punto de vista clínico como “el proceso mediante el cual se logra la fijación clínica y asintomática de un material rígido y aloplástico en el hueso” (Balasundaram G, 2006).

El proceso de oseointegración se inicia por la acción osteoclástica, células encargadas de reabsorber el tejido óseo necrotizado por la acción del fresado en la fase quirúrgica, el cual tiene como objetivo posicionar el implante en el espesor óseo. Posteriormente, se produce la formación de coágulos de fibrina y la adhesión de células sanguíneas y mesenquimales sobre la superficie del biomaterial. Para que ocurra la adhesión de las células es necesaria la adsorción de proteínas de la matriz extracelular sobre la superficie del material. Las células se unen mediante dominios específicos transmembrana (integrinas) a las proteínas extracelulares (fibronectina, vitronectina) previamente adsorbidas sobre el implante. Las células mesenquimales posicionadas, comienzan procesos de diferenciación a células osteoblásticas, lo cual conduce a la formación de tejido osteoide, y la mineralización posterior de este tejido (Berglundh et al., 2003; Masuda T, 1997). La oseointegración presenta procesos de establecimiento y de mantenimiento del tejido óseo. Ambas etapas son dinámicas, ya que se produce simultáneamente reabsorción y aposición ósea. En la fase de establecimiento, la reabsorción se produce en las zonas de contacto del implante con el tejido óseo, y la formación ósea en las zonas “libres de contacto”. En la etapa de mantenimiento, la oseointegración está dada por una continua remodelación y adaptación de este tejido a la función (Berglundh et al., 2003).

La oseointegración involucra una unión íntima y directa entre el implante y el tejido, sin una interfase material de por medio. Esto implica que no es un fenómeno aislado, sino que depende de otros procesos como la osteoinducción y osteoconducción. La osteoinducción (Wilson-Hench, 1987) es la capacidad de un

material para promover la formación de hueso en su superficie, induciendo a células mesenquimales o células osteoprogenitoras que se diferencien a células osteoblásticas. La osteoconducción consiste en que la superficie de un material favorece la unión de osteoblastos y células osteoprogenitoras, produciendo una estructura porosa a través de la cual pueden migrar nuevas células y se pueden producir nuevos vasos sanguíneos. Estos procesos resultan en que se forme y crezca hueso sobre la superficie de un material (Wilson-Hench, 1987).

Si bien en la formación de hueso están comprometidos complejos procesos biológicos que involucran células y proteínas, el componente mineral principal es conocido como hidroxapatita (HA). De esta forma, la bioactividad de un material de uso implantológico es comúnmente asociada a su capacidad de inducir la formación o mineralización de hidroxapatita, o alguna fase previa como el fosfato tricálcico, sobre su superficie, y en un ambiente fisiológico (Hench, 1991).

La velocidad y el grado de integración del tejido óseo a la superficie del implante es fuertemente influenciado por las características superficiales de éste, las cuales engloban dos aspectos esenciales: la topografía y su composición química (Ballarre et al., 2010; Junker et al., 2009; Le Guehennec et al., 2007).

2. Implantes y su superficie

Se han realizado numerosos estudios donde se destaca la importancia de la topografía de los implantes a una escala micrométrica. Entre ellos se encuentra un importante reporte (Buser et al., 1991), el cual comparaba varias preparaciones de superficies de titanio con una superficie electropulida, como control negativo, y un recubrimiento con hidroxapatita, como control positivo. Se observó que una superficie áspera con topografía micrométrica, preparada mediante un chorro de arena y un posterior grabado con ácido (sandblasting/etching), incrementaba la acumulación de hueso. Este resultado reiteraba lo obtenido en otros estudios anteriores en implantes de titanio (Gottfredsen et al., 1990). De esta manera, mientras mayor sea el contacto directo entre la superficie del implante y el tejido

(atribuido a la modificación de la superficie), más rápida será la formación de hueso, y mejor va a ser la naturaleza mecánica de la conexión implante-hueso.

En numerosas investigaciones se ha descrito el efecto de una topografía específica en la adherencia de osteoblastos sobre un implante de titanio (Keller et al., 2003; Ogawa and Nishimura, 2003; Schneider et al., 2003). Esta característica es muy importante debido a que el proceso de formación de hueso es atribuido en última instancia a la acción de proteínas y de los osteoblastos.

La modificación topográfica de las superficies de titanio a micro-escala es conocida y aceptada en el mercado implantológico. Se cree que la modificación a este nivel resulta favorable para la formación de hueso en la superficie del implante, lo cual es avalado por evidencia clínica (Cochran, 1999; Shalabi et al., 2006). Aun así, esas superficies han sido generalmente calificadas como dispositivos biocompatibles con una habilidad limitada para afectar directa y favorablemente el tejido circundante en cuanto a la formación de hueso se refiere. Hoy, un aspecto de creciente interés de la investigación de implantes endo-óseos está centrada en seguir mejorando la adhesión de las células formadoras de hueso en la interfase tejido-implante. Un camino para este objetivo es el uso de la ingeniería de superficies a nivel nanométrico, para producir modificaciones topográficas a esta escala, y así aprovechar las posibles ventajas que se pueden obtener sobre la adhesión de proteínas extracelulares y células osteogénicas.

3. Nanomateriales y superficie de implantes

La nanotecnología involucra materiales con alguna dimensión o que están compuestos por materiales de tamaño entre 1-100 nm. La aplicación de la nanotecnología a la superficie de los implantes dentales involucra una asociación bi-dimensional de las características de la superficie (a través y a lo largo del plano principal de la superficie). Estas nano-características pueden ser dispuestas de manera ordenada (isotrópica) y con formas definidas (hexagonal, cúbicas etc.) o de manera no-ordenada (anisotrópica) lo que a menudo depende de la técnica

utilizada y de la naturaleza del material. Cuando estos conceptos son aplicados a la superficie de los implantes, se busca dotar a la superficie con una estructura de escala nanométrica que genera un comportamiento fisicoquímico (unión química con el hueso) o bioquímico (alteración de la adsorción de proteínas o adhesión de células formadoras de hueso) de la superficie del implante. Las modificaciones a escala nanométrica de las superficies de implantes endo-óseos pueden afectar tanto la química como la topografía de la misma. Algunos investigadores (Albrektsson, 2004), dividen las propiedades de las superficies de los implantes en tres categorías: propiedades mecánicas, propiedades topográficas, y propiedades fisicoquímicas. Ellos indican que estas características están relacionadas, y que cambiando una de ellas, las otras también se verán afectadas. Esta importante observación parece ser aún más relevante en la discusión de modificaciones de la topografía a nivel nanométrico. La nanotopografía ha mostrado influir en la adhesión, proliferación, diferenciación y adhesión específica de las células (Balasundaram G, 2006). Estos cambios están relacionados con la química y la estructura de la superficie y dan lugar a importantes interacciones que permiten relaciones biomiméticas entre la superficie del material aloplástico del implante y el tejido vivo, involucrando las categorías antes mencionadas.

Las modificaciones nanométricas de la superficie de un implante pueden contribuir a imitar un ambiente celular que favorece el proceso de una rápida formación de hueso. Por ejemplo, se sugiere que la rugosidad de la superficie del hueso es de aproximadamente 32 nm (Mendonca et al., 2008).

Por otra parte, una superficie con nanotopografía parece afectar la interacción celular y alterar el comportamiento celular cuando se compara con el tamaño de la topografía de superficie convencional (micrométrico). Hay relaciones físicas diferentes a nivel celular entre la nano y la microtopografía de la superficie. Los efectos específicos de la nanotopografía en el comportamiento celular han sido demostrados utilizando un amplio rango de diferentes tipos de células (Meng et al., 2007). Las superficies nanoestructuradas poseen propiedades únicas que alteran la adhesión celular directa (interacción célula-superficie) e indirectamente (interacción proteína-superficie). Se cree que los cambios en la interacción inicial

entre la superficie y las proteínas que componen la célula controlan la adhesión de los osteoblastos (Balasundaram G, 2006). Este es un aspecto crítico en el proceso de oseointegración: cuando un implante entra en contacto con un ambiente biológico, la adsorción de proteínas que ocurre inmediatamente, guiará el proceso subsecuente de adhesión y proliferación celular. La rugosidad de la superficie a escala nanométrica es un factor importante en la interacción de las proteínas que afectarán directamente la actividad celular, para controlar la formación de tejido óseo en la superficie del implante (Park GE, 2005). Independientemente de la adsorción de proteínas en la superficie, las células tienen la habilidad de reconocer la nanoestructura. Adicionalmente a este efecto de adhesión celular, se ha encontrado también que las superficies nanoestructuradas pueden afectar la proliferación celular (Webster et al., 2000a; Zhao et al., 2006) y la diferenciación de las células (Webster et al., 1999). El mecanismo de cómo afectan las superficies nanoestructuradas en la modulación de la adhesión y proliferación de los osteoblastos no ha sido completamente dilucidado, Sin embargo un trabajo reciente derivado de este proyecto (Inzunza, 2012), demuestra que recubrimientos de sílice con una nanoestructura porosa de aproximadamente 4 nm, mejora considerablemente las propiedades *in vitro* de oseointegración; tales como mineralización de hidroxiapatita, adhesión de osteoblastos, adsorción de proteínas y diferenciación con actividad de osteogénica de células madres. Estos resultados se atribuyen a la alta área superficial del recubrimiento nanoporoso, que favorece la adsorción de proteínas y consecuentemente la adhesión y diferenciación osteogénica de las células.

4. Modificaciones en la superficie del implante de titanio

Actualmente son usadas muchas técnicas y vías para producir modificaciones nanométricas en superficies de implantes de titanio (Mendonca et al., 2008). Una de éstas involucra el método físico de compactación de nanopartículas de óxidos de titanio, que llevan a superficies con granulometría nanométrica (Webster and Ejiófor, 2004). Una ventaja de este método es que

conserva la química de la superficie entre diferentes tipos de topografía. Un segundo método es el tratamiento químico de superficies del material al exponerlas a reactivos tales como ácidos o álcalis (Zhou et al., 2007), y así crear una topografía nanométrica. Dicho método es muy popular actualmente en el campo de los implantes dentales. También se usan tratamientos químicos con peróxido de hidrógeno (Nanci et al., 1998) o con ácido fluorhídrico (Cooper et al., 2006) para crear nanoestructuras discretas, y así, mejorar el proceso de mineralización en la superficie del implante. Otra ruta para crear estructuras nanométricas en una superficie de titanio es la aplicación de métodos ópticos (litografía), los cuales se basan en el uso de una longitud de onda de dimensiones específicas para lograr una modificación a escala apropiada (Zhou et al., 2007). Sin embargo, estos enfoques requieren métodos intensivos de preparación y requieren un desarrollo mayor antes de ser trasladados al área clínica. El uso de láseres para promover una topografía en la superficie del titanio brinda solo modificaciones a nivel micrométrico, no alcanzando la escala nanométrica (Ricci JL, 2000).

Todas estas técnicas son en general complejas y requieren de un alto nivel de inversión en cuanto a energía, equipos y/o tiempo. Por otro lado, un camino para crear modificaciones en la superficie de materiales para implantes consiste en recubrirlos con películas. Un tipo de recubrimiento estudiado para este tipo de implantes es el recubrimiento con un *spray* de plasma de hidroxiapatita (Diefenbeck et al., 2011), sin embargo, a pesar de la bioactividad y biocompatibilidad de la hidroxiapatita, esta posee una baja adherencia a la superficie metálica, además, este tipo de recubrimientos no provee de una estructura definida y homogénea a la superficie. Por otro lado, existen los recubrimientos de sílice, que han demostrado ser capaces de prevenir la corrosión en aleaciones de titanio (Ti-6Al-4V) y acero inoxidable (316L) en un medio fisiológico (Gallardo J, 2001; Galliano P, 1998). La sílice también se conoce por ser un catalizador natural para la formación de hidroxiapatita, mostrando bioactividad en estudios *in vitro* (Galliano P, 1998; Parkhill RL, 2001) y en estudios *in vivo* (Ballarre et al., 2010; Duran A, 2004). En todos estos estudios, los

recubrimientos de sílice han sido preparados usando el método tradicional sol-gel para la elaboración de películas ya que es un método adecuado para lograr películas protectoras y biocompatibles sobre superficies de implantes metálicos (Ballarre et al., 2010; Duran A, 2004; Filiaggi et al., 1996). Mediante este proceso se obtiene un gel o una mezcla de sol/gel (dependiendo de las condiciones de preparación), el cual puede ser utilizado para recubrir la superficie del material de titanio, lográndose películas con un alto control de su nanoestructura.

5. Método Sol-Gel

Se denomina coloide a una suspensión en la cual la fase dispersa es tan pequeña (entre 1-1000 nm) que las fuerzas de gravedad son nulas y las interacciones están dominadas por fuerzas de corto alcance, tales como, las fuerzas de Van Der Waals, y cargas superficiales. Un sol es una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido. Un gel es una sustancia que contiene un esqueleto sólido y continuo encerrando un líquido o fase líquida continua. La continuidad de la estructura sólida provee de elasticidad al gel (Brinker CJ, 1990). Existen diversos tipos de sistemas de geles: los geles poliméricos (que forman enlaces permanentes), los geles gelatinosos (formados por cadenas enredadas) y los geles particulados (establecidos por enlaces reversibles, este tipo de geles a menudo puede ser redispersado mediante la agitación).

El proceso sol-gel, como lo dice su nombre, envuelve la evolución de redes inorgánicas a través de la formación de una suspensión coloidal (sol) y la gelación del sol para formar una red en una fase continua de líquido (gel). Hoy en día gracias a los avances de la nanotecnología es posible preparar mediante esta técnica materiales de características específicas para determinados usos y que poseen dimensiones nanométricas.

A través del proceso sol-gel, materiales óxidos inorgánicos y homogéneos con distintas propiedades ópticas, de dureza, transparencia, durabilidad química, porosidad adaptable y resistencia térmica pueden producirse a temperatura

ambiente, esto de manera opuesta a las altas temperaturas utilizadas en el proceso de fundido tradicional para obtener vidrios inorgánicos. Los usos específicos de estos vidrios y cerámicos obtenidos vía sol-gel derivan de varias formas de materiales generadas en el estado gel, por ejemplo: monolitos, películas, fibras y polvos (**Fig. 1**). (Brinker CJ, 1990).

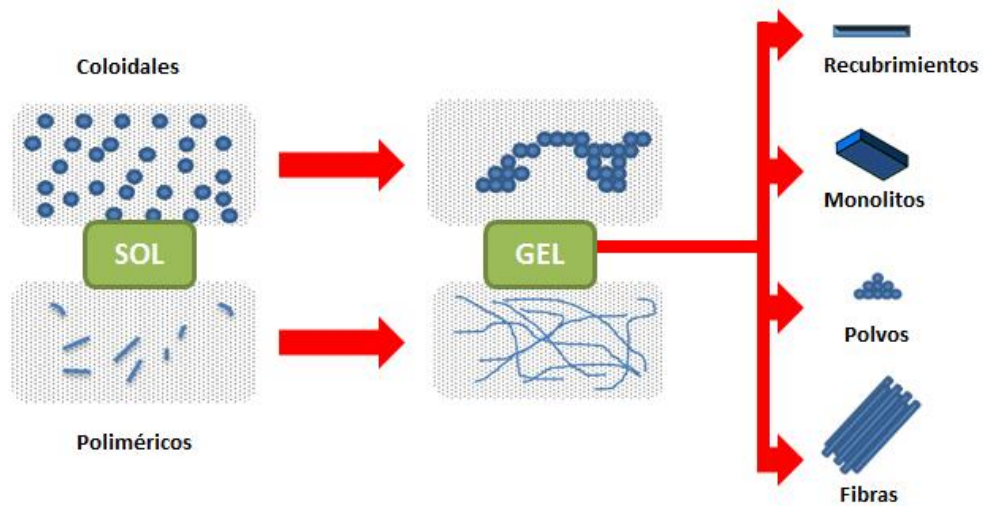


Figura 1. Proceso Sol-gel y sus productos.

Los precursores químicos necesarios para la síntesis de los coloides consisten en un elemento metálico o metaloide rodeado de varios ligandos reactivos. Los metal-alcóxidos son los precursores más comunes debido a que reaccionan rápidamente con el agua. Los alcóxidos más usados para esto son los alcoxisilanos, y dentro de estos, los dos más usados son el tetraetilortosilicato (TEOS, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) y el tetrametoxisilano (TMOS, $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$) (**Fig. 2**).

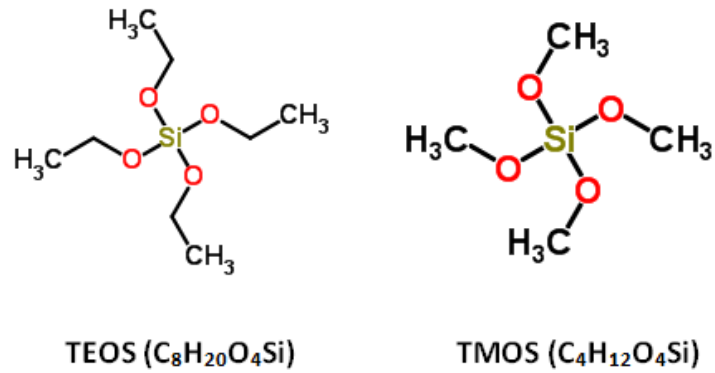


Figura 2. Precursores comunes de sílice en método sol-gel.

Generalmente se usan dos reacciones para describir el proceso sol gel, que corresponden a hidrólisis y condensación con la formación de agua o alcohol (**Fig. 3**).

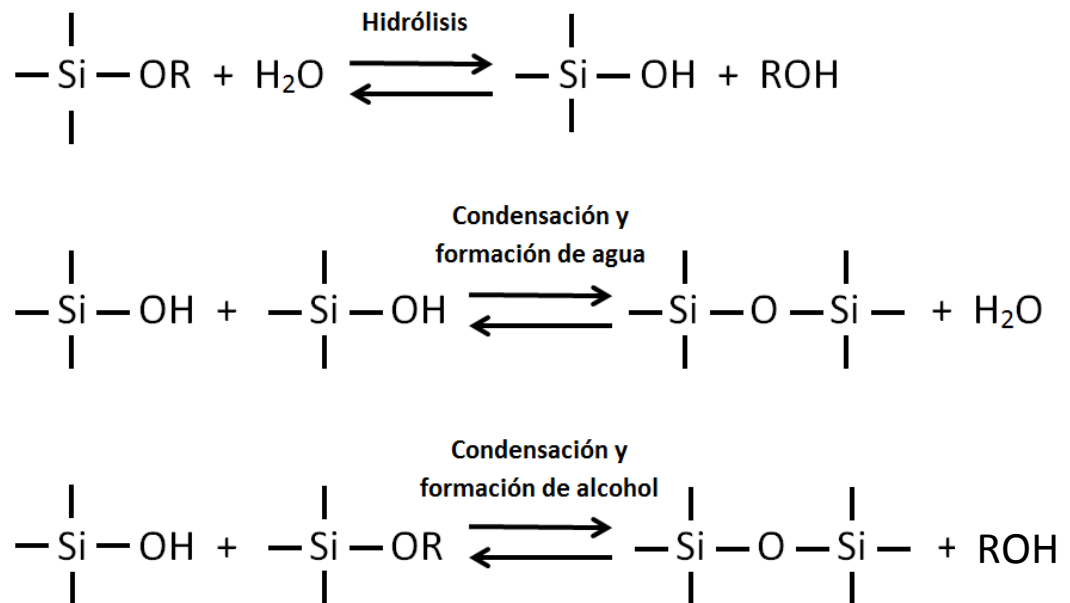


Figura 3: Reacciones reversibles de hidrólisis y condensación de silicatos en el proceso Sol-Gel.

En general, la reacción de hidrólisis a través de la adición de agua, reemplaza los grupos alcóxido (OR) por grupos hidroxilos. La subsecuente reacción de condensación involucran la formación de grupos silanoles Si(OH)_4 que posteriormente producen Si-O-Si (enlaces siloxanos) y la consecuente generación de agua o alcohol como en una clásica reacción de condensación. Este tipo de reacción puede continuar, y así, construir largas cadenas de sílice en un proceso de polimerización, en el cual el monómero o especie primaria a partir de la cual se construyen las cadenas es el grupo silanol Si(OH)_4 .

Adicionalmente, ya que el agua y los alcóxidos son inmiscibles, se utiliza un solvente mutuo, como el etanol (Rodríguez Reyes, 2008). Con la presencia de este agente homogeneizador, se facilita la hidrólisis debido a la miscibilidad del alcóxido en agua. A medida que el número de enlaces de siloxano aumentan, las moléculas individuales van interactuando, uniéndose y agregándose en forma conjunta al sol. Cuando las partículas se agregan, o se unen en una red, se forma el gel. Después del secado las especies volátiles atrapadas (agua, etanol) son retiradas y la red se contrae mientras algunas condensaciones pueden seguir ocurriendo. Las características y propiedades de una red sol-gel inorgánica en particular están relacionados con un número de factores que afectan el grado de hidrólisis y las reacciones de condensación, tales como, pH, temperatura, tiempo de reacción, concentración de los químicos participantes y tiempo de envejecimiento (Rodríguez Reyes, 2008).

Por otra parte, el proceso sol-gel puede combinarse con la química supramolecular de los surfactantes, resultando en una nueva generación de materiales con nanoporosos altamente ordenados.

6. Autoensamblaje: El método EISA

Los surfactantes son moléculas que contienen una parte apolar que consta de una larga cadena hidrocarbonada, y otra polar, que consta de una parte o “cabeza” polar soluble en agua. Estas moléculas a una concentración determinada

se reúnen y forman conglomerados llamados micelas (**Fig. 4**), la cual varía en su forma según el tipo de surfactante que se utilice.

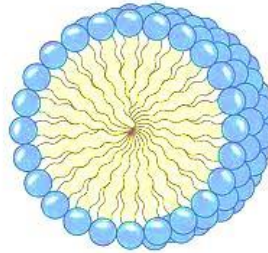


Figura 4. Estructura micelar.

La formación de las micelas es fundamental para las aplicaciones en las que se combina el proceso sol-gel con la química de surfactantes, debido a que la estructura micelar es la que da forma y define los poros de la estructura. Esto se debe a la organización espontánea o auto-ensamblaje de las micelas.

Una definición general de **autoensamblaje** es la organización espontánea de un material a través de interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, fuerzas electrostáticas) sin intervención externa. Cuando se produce el autoensamblaje de surfactantes en una solución acuosa de especies de sílice, se produce un co-ensamblaje espontáneo de mesofases de sílice-surfactante. Al remover el surfactante, aparecen nanoporos sólidos periódicos en la estructura de sílice, los cuales dependiendo del surfactante y las condiciones varían entre 1-10 nm de diámetro de poro. Esta habilidad de crear materia organizada a nivel micro, meso y nano ha significado en gran avance tecnológico (Bagshaw, 1995; Kresge, 1992). Estos novedosos materiales presentan un alto grado de versatilidad en términos de estructura, textura y funcionalidad (Soler-Illia, 2006). Aunque estos métodos permiten la preparación de una amplia variedad de materiales cerámicos modelados, los productos resultantes son polvos mal definidos, impidiendo su uso en la tecnología de películas finas. Sin embargo, la introducción del proceso de **autoensamblaje inducido por evaporación (Evaporation-Induced Self- Assembly, EISA)** (Brinker CJ, 1990; Yunfeng, 1997), brinda la posibilidad de una rápida producción

de estructuras porosas sobre un material o, si se desea, materiales nanocompósitos en forma de películas. Para realizar este método, se debe tener una solución homogénea de sílice soluble y surfactante preparada en solvente de etanol/agua, con concentraciones definidas de cada sustancia. Durante el proceso de recubrimiento por inmersión de las superficies (*dip coating*) y el proceso de recubrimiento por deslizamiento (*slip coating*) la evaporación preferencial del etanol concentra sobre la superficie del material el depósito de la película, el surfactante no volátil y las especies de sílice en agua. El progresivo aumento de la concentración del surfactante genera el auto-ensamblaje de la micela de sílice-surfactante y su posterior organización en una mesofase cristalina (**Fig. 5**). El resultado es la rápida formación de una película fina y continua en una mesofase que está orientada con respecto a la superficie del sustrato. Un subsecuente envejecimiento y tratamiento térmico, solidifican el esqueleto de sílice y así consolidan la meso estructura.

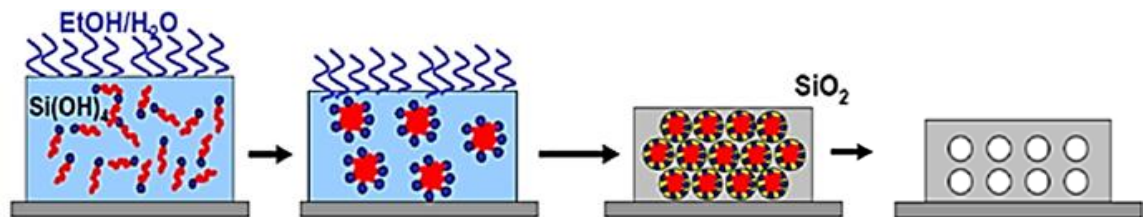


Figura 5: Esquema del proceso de auto-ensamblaje inducido por evaporación (EISA) para la formación de una película nanoporosa ordenada.

Los recubrimientos de sílice preparados a través del método sol-gel hacen posible la incorporación de nanopartículas de materiales bioactivos dentro de la matriz de la película, permitiendo el control del contenido y el grado de dispersión, sin alterar las propiedades originales tanto del recubrimiento como de las nanopartículas.

7. Química y superficie

La oseointegración no solo depende de la topografía micro o nano de la superficie de un implante, sino que también, de sus propiedades químicas. Las modificaciones químicas de la superficie del implante pueden inducir significativas respuestas óseas. Al impregnar o recubrir la superficie con elementos inorgánicos (fosfato o calcio) se puede estimular la interconexión bioquímica entre la matriz del hueso y la superficie del implante de titanio a través de hueso mineral o de proteínas sobre la superficie, y quizás, a través de la estimulación celular directa (Abron et al., 2001; Buser et al., 2004)

Existen materiales cerámicos bioactivos como la hidroxiapatita (HA) sintética ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y bio-vidrios o vidrios bioactivos (Bioglass, BG), que debido a su composición y propiedades pueden ser utilizados para estimular químicamente la formación de tejido óseo. Por un lado, la hidroxiapatita posee una excelente biocompatibilidad, posiblemente, por su similitud con el material inorgánico del hueso (hidroxiapatita “natural”). Por otra parte, el vidrio bioactivo ha demostrado recientemente tener características osteoinductivas y osteoconductoras (Xynos et al., 2000; 2001), además de su bien conocida capacidad de inducir la formación de hidroxiapatita en su superficie dentro de un medio fisiológico, lo que los ha convertido en materiales incluso más promisorios que la hidroxiapatita sintética en cuanto a su uso en aplicaciones biomédicas.

El vidrio bioactivo está compuesto principalmente de sílice (SiO_2) con iones de calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{3-}) en su estructura, y otros elementos en menores proporciones (Na^+ , K^+) específicas. La explicación de la bioactividad del BG no está completamente elucidada, pero su descubridor, Larry Hench, propuso un mecanismo para explicar, el cual es generalmente aceptado. Este mecanismo se basa en la disolución controlada del material, el cual provoca la liberación selectiva de calcio y silicio al medio (Hench, 1991). Además, compuestos como el fosfato generan un aumento en la deposición de apatita en la superficie del vidrio bioactivo, además de incrementar la habilidad de interconexión con el hueso (Hamadouche et al., 2001). Por otro lado, es conocido que el BG presenta

superior bioactividad que la HA. Desde su descubrimiento, el BG ha sido aplicado como material para el relleno y reparación ósea, debido a su mejorada biocompatibilidad, osteoconductividad y osteoinductividad. El BG es osteoestimulativo debido a su habilidad para estimular la producción de factores de crecimiento (Valerio et al., 2005). El BG también afecta la diferenciación de células mesenquimales en células productoras de tejido óseo (osteoblastos), y mejora la osteogénesis mediante un control indirecto de genes que regulan el ciclo celular hacia un fenotipo maduro de osteoblastos (Hench, 2009).

Las críticas a los vidrios cerámicos de tamaño de partícula micrométrico, apuntan a su proceso de fabricación, en las cuales se utilizan altas temperaturas para su síntesis (1400°C), estrecho rango de composición en el cual poseen bioactividad y limitadas características texturales (Jones et al., 2001; Jones et al., 2006). Sin embargo el proceso sol-gel ha logrado perfeccionar el procedimiento de obtención, el tamaño y la calidad de estos materiales bioactivos.

8. Nanopartículas bioactivas y oseointegración

Además de las películas nanoporosas, el proceso sol-gel permite la elaboración de partículas de tamaño nanométrico, sintetizadas a temperatura ambiente y con propiedades bioactivas en rangos mucho más amplios. Las nanopartículas de BG (nBG) o nanopartículas de hidroxiapatita (nHA), poseen mejores propiedades de bioactividad que sus similares de tamaño micrométrico, debido a la mayor superficie específica que poseen los materiales de dimensiones nanométricas. La alta razón de aspecto (relación área/volumen) de estos materiales, permite que exista una mayor área por unidad de volumen interactuando con el medio. Debido a esto, se presentan como una promisoría alternativa para la elaboración de recubrimientos que mejoren la oseointegración de los implantes dentales.

En primera instancia la bioactividad de los nano-vidrios cerámicos se debe, como ya se mencionó, a la solubilidad del vidrio, que a su vez permite el

intercambio iónico, entre la superficie del vidrio bioactivo y el medio fisiológico. Luego se forma una capa de carbonato-hidroxiapatita (HCA) deficiente en calcio, que posteriormente interactúa con el organismo para formar la unión entre el material y el tejido circundante. Aun así, la manera en que interactúa esta capa y el tejido biológico es un proceso que aún no se determina con claridad. Sin embargo se acepta que sucede a través de procesos como la adsorción de proteínas, la incorporación de fibras de colágeno desde el huésped, la fijación de células progenitoras de hueso, diferenciación celular y la formación de una matriz extra celular y su posterior mineralización (Zhong and Greenspan, 2000). Cabe decir que todos los procesos anteriores ocurren debido a interacciones ocurridas a nanoescala.

La nanoestructura determina el grado de disolución de los iones, los cuales son liberados para estimular la formación de hueso nuevo. La estructura a nanoescala, por lo tanto, afecta directamente el grado de reabsorción ósea y las propiedades osteogénicas, a través de la liberación selectiva de iones de calcio y silicio, los cuales son esenciales para estimular la actividad de los osteoblastos (Xynos et al., 2001). Cuando se comparan vidrios bioactivos nanométricos y micrométricos, se observa que los primeros presentan diferencias más allá del tamaño de la partícula, también se diferencian en su estructura y composición química (Zhong and Greenspan, 2000). La consecuencia de esto es que los vidrios bioactivos de tamaño nanométrico exhiben mayores grados de formación de apatita, muestran una mejor homogeneidad y pureza y poseen excelentes propiedades de degradación-reabsorción que sus símiles de tamaño micrométrico (Hamadouche et al., 2001).

Así como el BG la HA también puede ser preparada con un tamaño de partícula nanométrico. Esto ha sido reportado de forma relativamente reciente (K.P. Sanosh, 2009). El tamaño nanométrico en la HA no solo aumenta el área específica y razón de aspecto del material, si no que además, se asemeja mucho mas al material del diente humano, compuesto por nanocristales de HA y colágeno (Fratzl P, 2004).

En un estudio reciente paralelo a este proyecto (Valenzuela et al., 2012) se demostró que las nanopartículas de HA y BG aceleran considerablemente el proceso de formación de hidroxiapatita en suero fisiológico simulado (SBF), presentando el BG una mayor bioactividad. En otro trabajo (Valenzuela, 2012) estas partículas fueron incorporadas en recubrimientos de sílice nanoporosa sobre superficies de titanio. Se observó que las modificaciones químicas atribuidas a la incorporación de nanopartículas bioactivas y modificaciones texturales debidas al recubrimiento nanoporoso y ordenado en la superficie de una aleación de titanio, incrementan la bioactividad, adsorción de proteínas y la actividad celular. Esto recubrimientos podrían ser una alternativa para mejorar las propiedades de oseointegración de los implantes dentales, aumentando el éxito clínico de este tipo de tratamientos.

HIPÓTESIS

El recubrimiento de una superficie de un implante de titanio con una película de sílice compuesta de una nanoestructura altamente ordenada y cargada con partículas bioactivas, mejora el grado de oseointegración *in vivo* del material.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vivo* el efecto de los recubrimientos bioactivos nanoporosos en la oseointegración de implantes de titanio, usando un modelo animal en rata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar recubrimientos nanoporosos ordenados cargados con partículas bioactivas sobre superficies de implantes de titanio mediante técnica EISA/sol-gel.
2. Caracterizar la nanoestructura de los recubrimientos formados sobre las superficies de los implantes.
3. Realizar la implantación quirúrgica exitosa de los implantes en los modelos de rata.
4. Observar histológicamente el grado de oseointegración logrado con los implantes en el hueso circundante.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describen los materiales y métodos empleados para la realización de este estudio experimental *in vivo*.

1. MATERIALES

1.1 Preparación de recubrimientos y aplicación sobre implantes

- Micro-implantes ortodóncicos de aleación de titanio (ASTM F136, Ti6Al4V) 1,5x7 mm (Biomaterials Korea ®)
- Tetraetilortosilicato (TEOS, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) (Aldrich ®)
- Etanol 95% técnico (Sudelab ®)
- Ácido clorhídrico (HCL) P.A 37% p/p (Merck ®)
- Copolímero anfifílico de bloque, Pluronic 123 P.A $(\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_{70}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}\text{H})$ (Aldrich ®)
- Nanopartículas de nBG sintetizadas (Valenzuela et al., 2012)
- Nanopartículas de nHA sintetizadas (Valenzuela et al., 2012)

1.2 Implantación experimental *in vivo* y eutanasia

- Lidocaína tópica 2% (Xylocaína gel tópico, Astra Zeneca ®)
- Ketamina 100 mg solución inyectable (Ketostop, Dragpharma ®)
- Xilacina 100 mg solución inyectable (Xila-10, Dragpharma ®)
- Ketoprofeno 100 mg solución inyectable (Ket-10, Dragpharma ®)
- Povidona Yodada 10% (Difexon, Bago ®)
- Jeringa hipodérmica 1 y 5 ml
- Fresa quirúrgica para colocación de implantes (diámetro 1,2 mm)
- Llave de torque manual modelo SDH1, SDB12 (Biomaterials Korea ®)

1.3 Procesamiento de tejidos para histología

- Etanol (EtOH) 70%, 95%, 100% (Sudelab ®)
- Acetona 100% (Aldrich ®)
- Metil-metacrilato (monómero) (MMA, C₅H₈O₂) (Aldrich ®)
- Peróxido de Benzoilo (activador) ((C₆H₅CO)₂O₂) (Aldrich ®)
- Tinción azul de toluidina (Aldrich ®)

1.4 Materiales de laboratorio

- Pinzas, espátulas
- Frascos de vidrio con tapa 50, 100 ml
- Micropipetas 10, 100 y 1000 µl
- Portaobjetos
- Viales de vidrio 20 ml

1.5 Equipos y máquinas utilizadas

- Balanza analítica (Radwag®)
- Motor quirúrgico de baja velocidad 210W, 200-40000 RPM (NSK®)
- Motor de baja velocidad 12V 2 RPM, con modulador de velocidad
- Microscopio óptico Axioskop (Zeiss ®)
- Microscopio electrónico de barrido (SEM) (Zeiss ®)
- Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM) (FEI ®)
- Microscopio electrónico de barrido con retrodispersión de electrones (BSE-SEM) y microanálisis EDX (Jeol® 6360 LV)
- Estufa 220° C Mermmetr® X-200
- Cortadora de precisión Isomet® 1000 equipado con hoja diamantada Buehler® 4" x 0,012" (100 x 0,3 mm)
- Baño termoregulado con agitación Labtech®
- Sonificador 750 W Labtech®
- Mufla programable (1200° C) Labtech®

2. MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

2.1.1 Preparación de soles

Se prepararon dos tipos de soluciones “sol-gel” para ser utilizadas como recubrimientos nanoestructurados de sílice, uno de ellos cargado con nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) y el otro con nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG).

Las nanopartículas de nHA y nBG a utilizar en este trabajo fueron sintetizadas en una etapa anterior de este proyecto, cuyo procedimiento aparece recientemente publicado (Valenzuela et al., 2012)

La secuencia de preparación de los soles es la siguiente (**Fig. 6**):

- a) Sobre una mezcla de 10 ml de etanol 95% y 0.5 ml HCl 0,5 M en agitación magnética, se agregaron 4 ml de TEOS y se mantuvieron de esta forma por 20 minutos a pH 2. Con esto se logró la hidrólisis del TEOS y se obtuvo el sol transparente.
- b) Sobre 20 ml de etanol 95% se dispersó una cantidad adecuada de nBG o nHA en un sonicador por 20 minutos. Para obtener la cantidad de nanopartículas a utilizar se realizó una ecuación que se explica posteriormente. Luego, se le aplicó agitación magnética por 5 minutos, proceso que se realizó 2 veces para lograr una suspensión homogénea y sin aglomeraciones de partículas.
- c) Se disolvió 2 g del surfactante (Pluronic 123) en 10 ml de etanol 95% con continua agitación magnética y se mantuvo de esta forma por 20 minutos.
- d) Posteriormente, se vertió la suspensión de nanopartículas sobre el TEOS hidrolizado en agitación constante, y se dejó por 20 minutos para homogeneizar. Luego, se agregó la solución de surfactante. finalmente, el sol cargado con nanopartículas se dejó en agitación durante 3 horas.

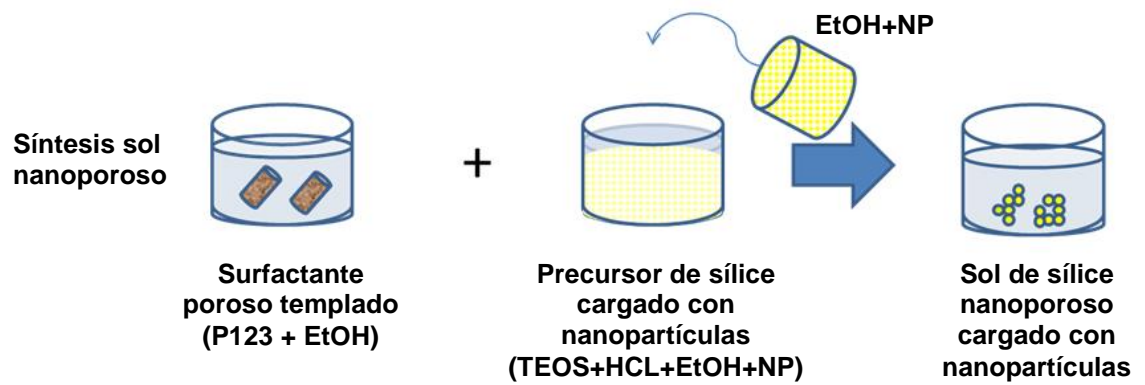


Figura 6: Esquema de síntesis sol nanoporoso cargado con nanopartículas

2.1.2 Cálculo del dopaje de nanopartículas

El porcentaje de dopaje de nanopartículas en los soles está definido respecto a la masa de sílice que se obtuvo a partir de la evaporación de 5 ml de sol, la cual fue de 0,0227 g.

Así, la cantidad de gramos de sílice presentes en 20 ml de sol viene dada por la siguiente expresión:

$$x = \frac{0,0227g \times 40 ml}{5 ml}$$
, donde $x = 0,18$ g de sílice para 40 ml de sol, debido a esto, se puede expresar la cantidad de nanopartículas requeridas para los porcentajes deseados:

$$masa\ de\ nanopartículas = \frac{\% \text{ requerido de NP} \times 0,18}{100}$$

Se escogió un porcentaje de nanopartículas de un 10%, debido a que un trabajo anterior (Valenzuela, 2012) observó que con este porcentaje se puede sintetizar un recubrimiento que combina la presencia de nanopartículas con una nanoestructura ordenada, sin alteraciones. Además este porcentaje fue el utilizado para evaluar la bioactividad *in vitro* del recubrimiento. Por lo tanto para preparar 40

ml del sol dopado al 10 % se emplearon 0,02 g de nanopartículas, tanto de nHA como de nBG.

2.2 Recubrimiento del implante

Los recubrimientos nanoestructurados de sílice cargados con nHA y nBG fueron depositados sobre microimplantes ortodóncicos de 1.5 mm de diámetro por 7 mm de longitud (Korea Biomaterials Inc.), utilizando la técnica Sol-Gel de Autoensamblaje Inducido por Evaporación (EISA) (C. J. Brinker, 1999; Y. Lu, 1997). Usando un procedimiento “*dip-coating*” (**Fig. 7**). Este procedimiento fue descrito para soles de sílice pura, pero fue adaptado en este trabajo para soles de sílice con nanopartículas bioactivas. El sol fue vertido en el interior de una placa Petri y colocado sobre un soporte de altura variable (“Jiffy Jack”). Los implantes fueron sumergidos verticalmente en los soles a una velocidad controlada de 0,3 mm/s, mantenidos en el sol durante 1 minuto y luego removidos a una velocidad controlada de 0,3 mm/s utilizando un motor de baja velocidad diseñado para este propósito (**Fig. 8**). Los implantes con el recubrimiento en su superficie, fueron envejecidos por 24 horas a 35°C en una estufa y luego calcinados a 450°C por 4 horas, utilizando una velocidad de calentamiento de 0.5°C por minuto. De esta forma se obtuvo implantes con un recubrimiento poroso de sílice cargado con nanopartículas bioactivas. Finalmente, los implantes fueron esterilizados durante una hora mediante radiación ultravioleta (UV) y luego almacenados en envases estériles para evitar su contaminación.

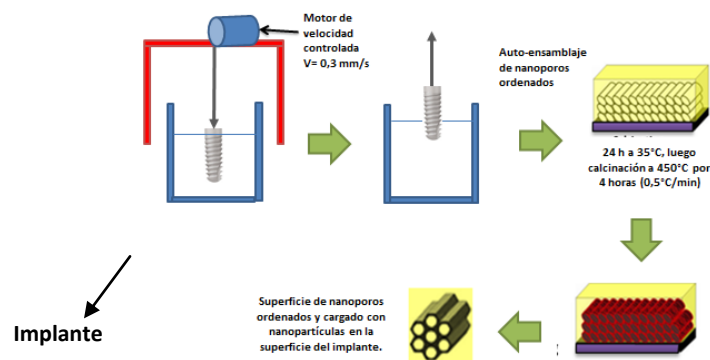


Figura 7: Proceso de recubrimiento EISA

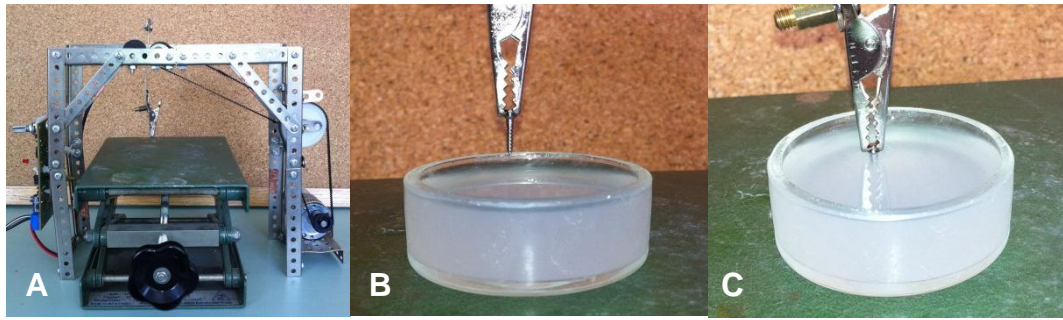


Figura 8: (A) Máquina con motor de velocidad controlada, (B) implante posicionado de forma vertical, (C) Procedimiento *dip-coating*.

2.3 Caracterización del implante y los recubrimientos

Los implantes de titanio sin modificar así como aquellos modificados con los recubrimientos dopados con nHA y nBG fueron observados por microscopía electrónica de barrido (SEM), con el propósito de determinar la continuidad del recubrimiento y su nivel de fractura. Para esto, las muestras se metalizaron con una mezcla de oro/platino, y luego, fueron puestas sobre el porta muestras del microscopio SEM para su observación.

También se realizó la caracterización de la nanoestructura de los recubrimientos mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM), para verificar la presencia de la estructura nanoporosa.

2.4 Implantación experimental

La oseointegración *in vivo* se evaluó utilizando un modelo animal en rata. Se utilizaron en total 11 ratas (cepa *Sprague Dawley*), fijando 1 implante en cada rata. La cantidad de ratas y la distribución de los implantes usados en ellas se muestra en la **Tabla 1**. El sitio de implantación escogido fue la metáfisis proximal de la tibia, tal como ha sido utilizada en experiencias anteriores (Diefenbeck et al., 2011; Vandamme et al., 2011).

TIPO DE IMPLANTE	TIEMPO DE IMPLANTACIÓN	N° DE RATAS
Implante sin modificar (Ti)	3 semanas	1
	6 semanas	2
Implante con recubrimiento nHA	3 semanas	2
	6 semanas	2
Implante con recubrimiento nBG	3 semanas	2
	6 semanas	2
TOTAL		11

Tabla 1: Cantidad de ratas utilizadas y distribución de implantes en ellas.

La inducción de la anestesia y su mantención se realizó con ketamina (100 mg/Kg) más xilacina (13 mg/Kg) administrada por vía intraperitoneal y lidocaina de uso tópico (4%), previo a la incisión de la piel. Para la inserción de los implantes se utilizó una modificación de la técnica *Flapless* (Bayounis et al., 2011; Jeong et al., 2007; Jeong SM, 2012). La técnica de implantación consistió en realizar la perforación con una fresa quirúrgica de 1,2 mm de diámetro en el sitio elegido de forma directa, previo afeitado y desinfección de la zona, abarcando en un tiempo operatorio la introducción de la fresa en el tejido blando (piel y tejido subcutáneo) y tejido duro (hueso). El sitio de implantación fue irrigado con suero fisiológico durante la perforación, para propósitos de limpieza y refrigeración. Luego mediante torque manual se introdujo el implante en el hueso (**Fig. 9**). Finalmente la herida fue cerrada y aislada con un apósito, para evitar que el animal se muerda la zona intervenida. Este método evita la realización de incisiones y colgajos más invasivos, disminuyendo el tiempo operatorio y mejorando el estado post-operatorio. Terminada la cirugía, se verificó la posición de los implantes en el

hueso mediante rayos X. La analgesia postquirúrgica fue administrada mediante una inyección intramuscular de ketoprofeno (9 mg/Kg) hasta el segundo día post-implantación. Todo el procedimiento fue realizado en un pabellón con las condiciones necesarias para la realización de la cirugía y estuvo regido de acuerdo a protocolos aprobados por el comité de bioética institucional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, correspondiente a los cuidados antes, durante y después del procedimiento quirúrgico (**Anexo 1**).



Figura 9: Procedimiento de implantación *flapless*: (A) Perforación del tejido. (B) Introducción del implante. (C) Radiografía mostrando el implante posicionado.

El período de espera para la consolidación de los implantes fue de 3 semanas para el primer grupo y de 6 semanas para el segundo grupo. Durante este período los animales fueron controlados en peso, actividad y estado de ánimo en el bioterio del Laboratorio de Terapia Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Terminado este período, los animales fueron eutanasiados, para la extracción de las muestras de tejido óseo/implante. En este procedimiento se administró vía intraperitoneal una dosis letal de anestesia (ketamina 300 mg/Kg más xilacina 13 mg/Kg).

2.5 Procesamiento de las muestras

Para el tratamiento de las muestras se utilizó un protocolo de inclusión de muestras óseas no descalcificadas en metil-metacrilato (MMA) (Peris J. L, 1993). Las muestras obtenidas fueron limpiadas del tejido blando adyacente, para obtener piezas de tejido óseo y del implante fijado a él. Los tejidos obtenidos fueron fijados con formalina tamponada (10%) durante 48 horas, y deshidratados mediante concentraciones crecientes de alcohol (70%, 95%, 100%), manteniendo las muestras durante 1 hora en cada solución. Las muestras fueron luego secadas al ambiente durante ~10 minutos, para posteriormente realizar la infiltración de las muestras con mezclas de acetona y MMA, donde la proporción de acetona fue decreciendo (proporciones en volumen acetona/MMA de 1:2, 1:5, 1:10 respectivamente, por una hora cada uno) hasta llegar a una solución pura de MMA. Se esperó la polimerización hasta la formación de bloques plásticos transparentes de 1 cm de diámetro, que contenían las muestras hueso implante orientadas de manera que se consiguieran cortes transversales del implante y el hueso circundante (**Fig. 10**).

Para el corte de los bloques en varias secciones, se utilizó una cortadora de precisión, equipada con una hoja diamantada de baja velocidad, refrigerada con agua. El grosor de los cortes fue de 500 μm . las muestras seccionadas pasaron por un baño de H_2O A $60^\circ\text{-}70^\circ$ y luego fueron depositadas directamente sobre el porta-objetos.

Finalmente se seleccionaron muestras para microscopía óptica, las cuales fueron tratadas con la tinción de azul de toluidina, esta tinción permite la diferenciación de tejido blando/fibroso, tejido osteoide y hueso maduro. Otro grupo de muestras fue seleccionada y observada mediante microscopía de barrido con retrodispersión de electrones (BSE-SEM) en conjunto con un análisis elemental mediante energía dispersiva de rayos X (EDX)

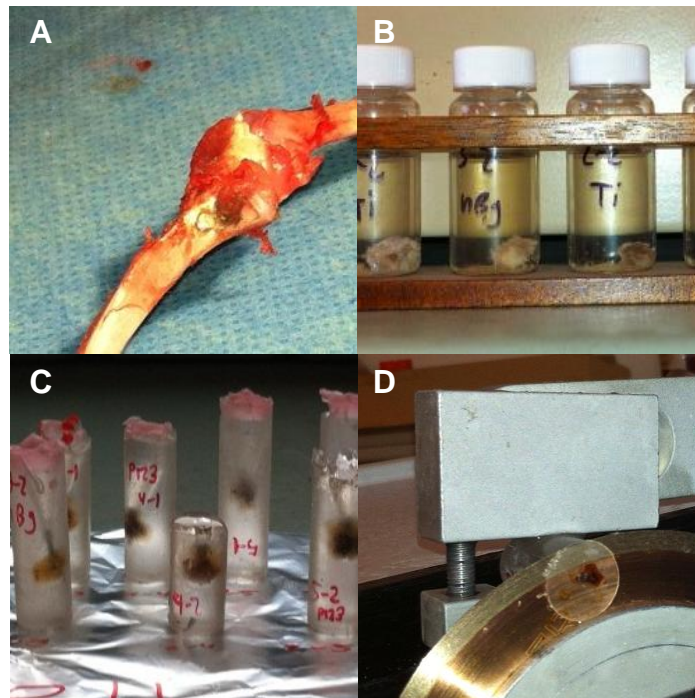


Figura 10: Tratamiento de tejidos: (A) Remoción de tejidos blandos. (B) Fijación. (C) Bloques de MMA con las muestras de tejido inmersas. (D) Corte transversal de las muestras.

2.6 Análisis histológico de las muestras

Los cortes de tejido óseo/implante fueron analizados histológicamente mediante microscopía óptica, identificando las zonas de tejido óseo neoformado. La interfase hueso-implante fue analizada a mayor resolución mediante microscopía de barrido con retrodispersión de electrones (BSE-SEM) en conjunto con un análisis elemental mediante energía dispersiva de rayos-X (EDX). La microscopía BSE-SEM permite observar las muestras contrastando las zonas con mayor tejido mineralizado con las de menor contenido de hueso maduro. El análisis EDX indica la proporción y el porcentaje en peso de cada elemento químico presente en la interfase hueso/implante.

RESULTADOS

1. Caracterización superficial de los implantes

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), se obtuvieron imágenes a diferentes escalas de los micro implantes, tanto de los modificados superficialmente con los recubrimientos, como de los implantes sin modificar, a modo de control.

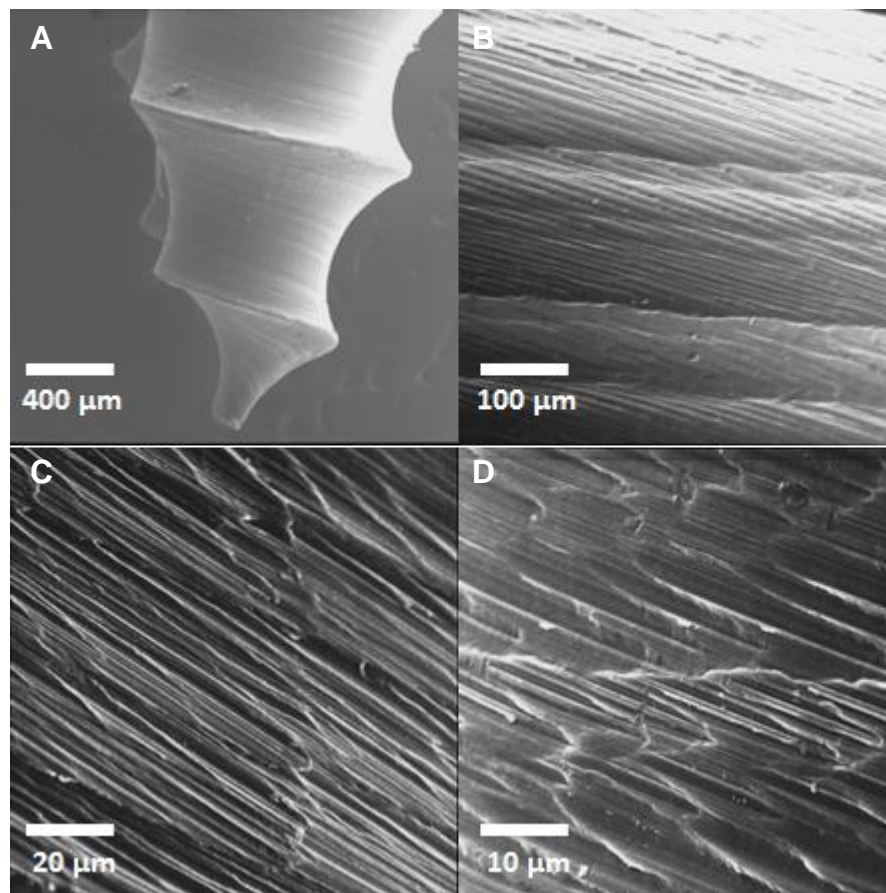


Figura 11: Imágenes SEM de la superficie del implante de titanio sin modificar (Ti). Magnificación: 50X (A), 500X (B), 1000X (C), 2000X (D).

En la **Figura 11**, se observa la topografía del implante de titanio sin modificar (Ti). Se aprecia su superficie maquinada, relativamente regular, pero sin presencia de porosidades ni modificaciones superficiales significativas.

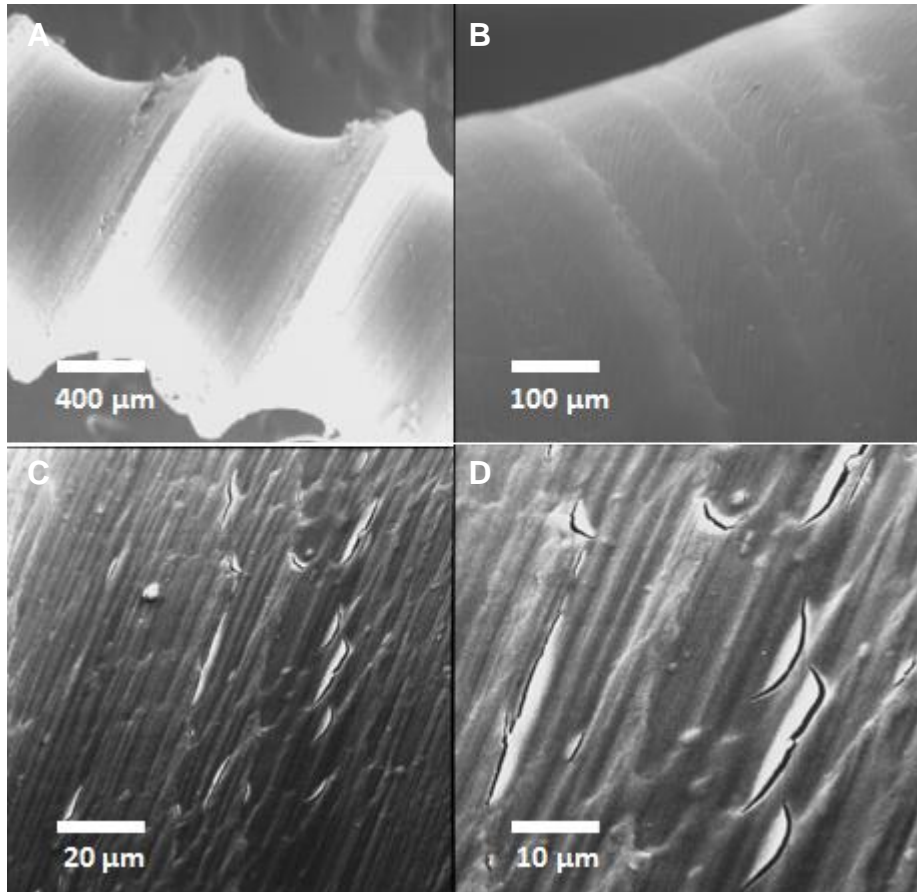


Figura 12: Imágenes SEM de la superficie del implante de titanio modificada con el recubrimiento bioactivo nanoestructurado cargado con nHA. Magnificación: 50X (A), 500X (B), 1000X (C), 2000X (D).

En la **Figura 12**, se muestra la superficie del implante modificado con el recubrimiento nanoestructurado cargado con nanopartículas de HA al 10%. Se puede apreciar en las imágenes de mayor aumento la presencia del recubrimiento, se observan solo pequeñas y aisladas fracturas superficiales del recubrimiento, de un grosor menor a $1\ \mu\text{m}$, mientras que la mayoría de la superficie restante se observa continua y homogénea, sin zonas de exposición de la superficie de titanio.

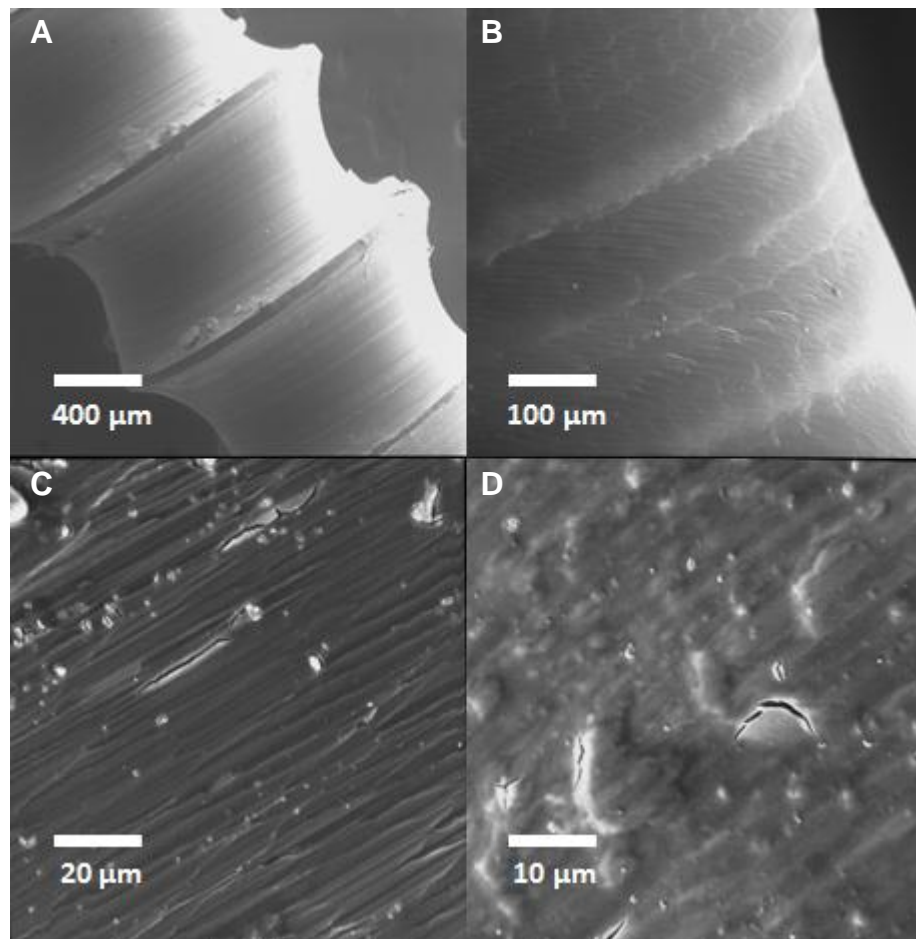


Figura 13: Imágenes SEM de la superficie del implante de titanio modificada con el recubrimiento bioactivo nanoestructurado cargado con nBG. Magnificación: 50X (A), 500X (B), 1000X (C), 2000X (D).

En el caso del implante con el recubrimiento nanoestructurado cargado con nBG 10% (**Fig. 13**), se observó una superficie similar a la del recubrimiento de nHA 10%, con una superficie sin defectos superficiales y fragmentos de material desprendido, continuo y homogéneo. También se apreciaron aisladamente microfracturas superficiales del recubrimiento, de grosores que no son superiores a 1 μm y de longitudes menores a las encontradas en el recubrimiento anterior (5-10 μm aproximadamente).

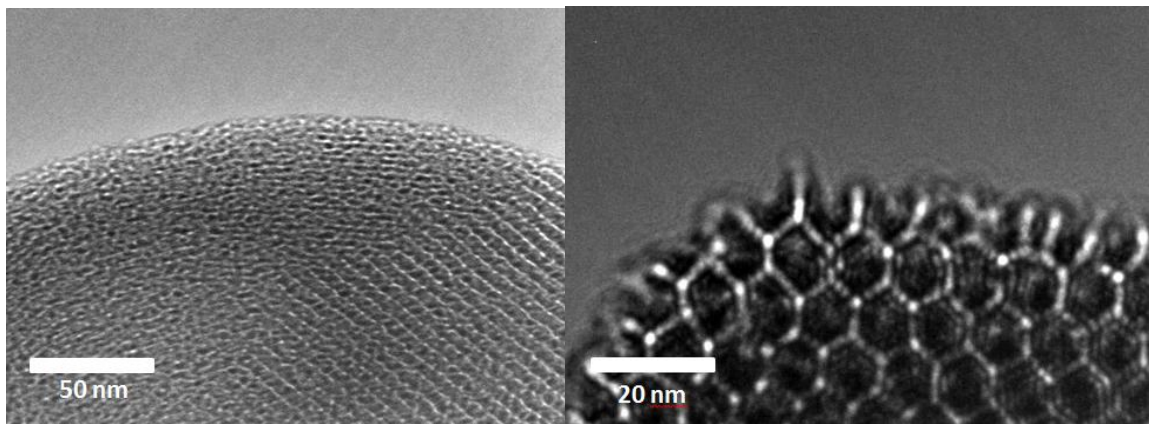


Figura 14: Imágenes HR-TEM de los nanoporos presentes en los recubrimientos.

La caracterización de la nanotopografía de los recubrimientos bioactivos aplicados a los implantes de titanio puede apreciarse más detalladamente en la **Figura 14**. Se observan imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) de la estructura porosa altamente ordenada, compuesta por canales hexagonales de aproximadamente 6,5 nm de diámetro que están preferentemente orientados paralelos a la superficie. Esta conformación es consecuencia del ordenamiento micelar del surfactante P123 durante el proceso de autoensamblaje inducido por evaporación (EISA).

2. Análisis de histología con microscopía óptica

En las **figuras 15 y 16**, se muestran las imágenes de microscopía óptica obtenidas de cortes histológicos hueso/implante teñidas con azul de toluidina, donde el tejido óseo aparece con coloración azul, el osteoide en rosa pálido y los espacios medulares o tejido fibroso/blando en un tono claro.

En las muestras obtenidas a las 3 semanas post-implantación (**Fig. 15**) se observa una marcada diferencia con respecto a la interfase hueso/implante, entre el implante de titanio sin modificar (Ti) y los implantes con los recubrimientos nanoestructurados cargados con partículas bioactivas (nBG, nHA). La cantidad y tamaño de gaps o brechas existentes en la interfase es considerablemente mayor en el grupo de muestras que contienen el implante sin modificar. Además en esta muestra, no se observa un marcado desarrollo de tejido óseo maduro (zonas de color azul) en la periferia del implante, solo algunas zonas que muestran la presencia de tejido óseo de forma incipiente. Con respecto a los implantes con recubrimientos bioactivos nanoestructurados, se observa un mayor crecimiento de tejido óseo en la interfase, se aprecian menor cantidad y tamaño de gaps, el perímetro de los implantes está prácticamente rodeado por tejido óseo y hay mayor cantidad de células cercanas a la interfase hueso/implante. La muestra histológica del implante con el recubrimiento bioactivo nBG, es la que presenta mejores resultados en los parámetros antes mencionados.

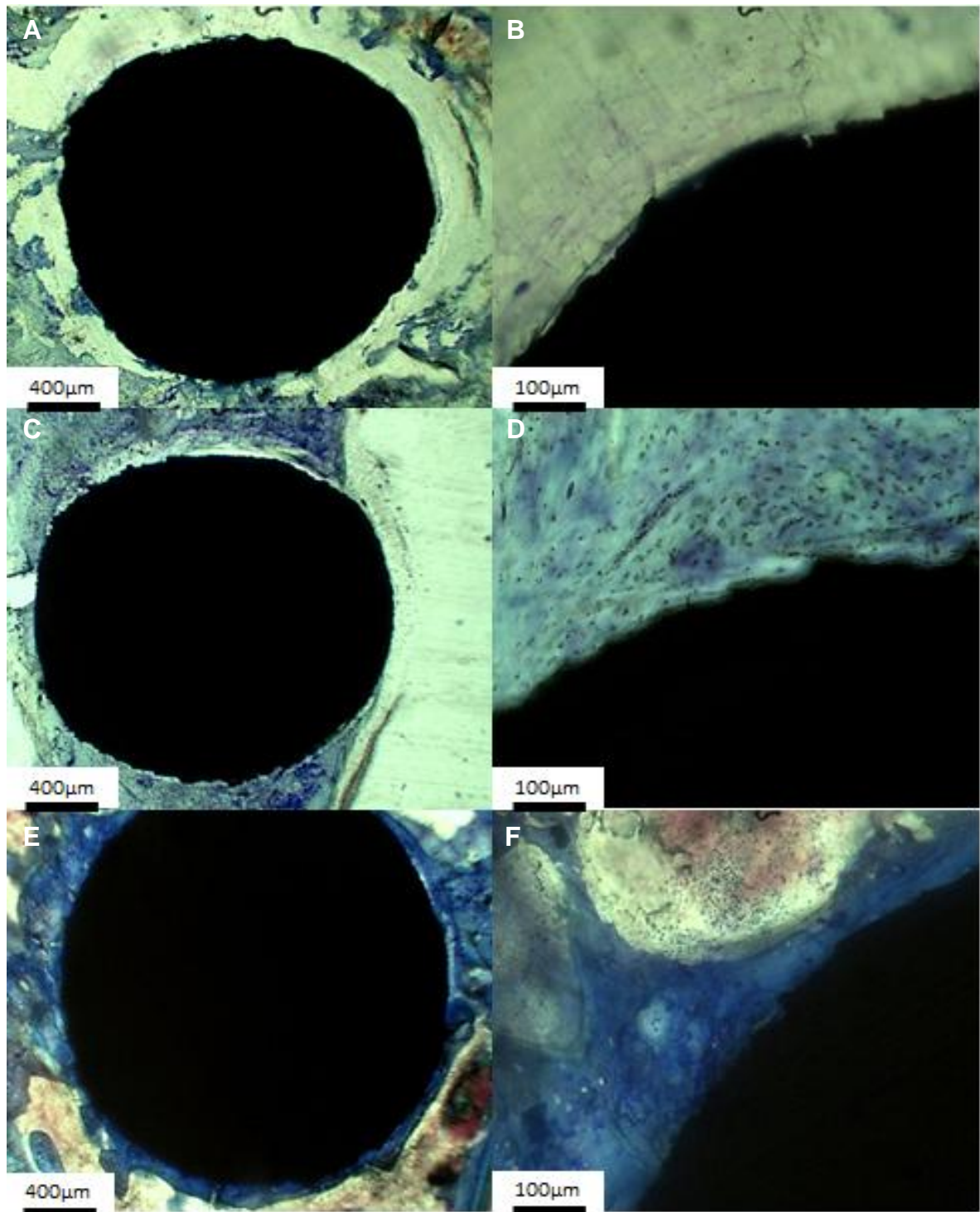


Figura 15: Imágenes de microscopía óptica de las muestras hueso/implante teñidas con azul de toluidina a las 3 semanas post-implantación. Muestras de implantes de titanio sin modificar (A y B), implante con recubrimiento nHA (C y D), implante con recubrimiento nBG (E, F). Magnificación 10X, 40X.

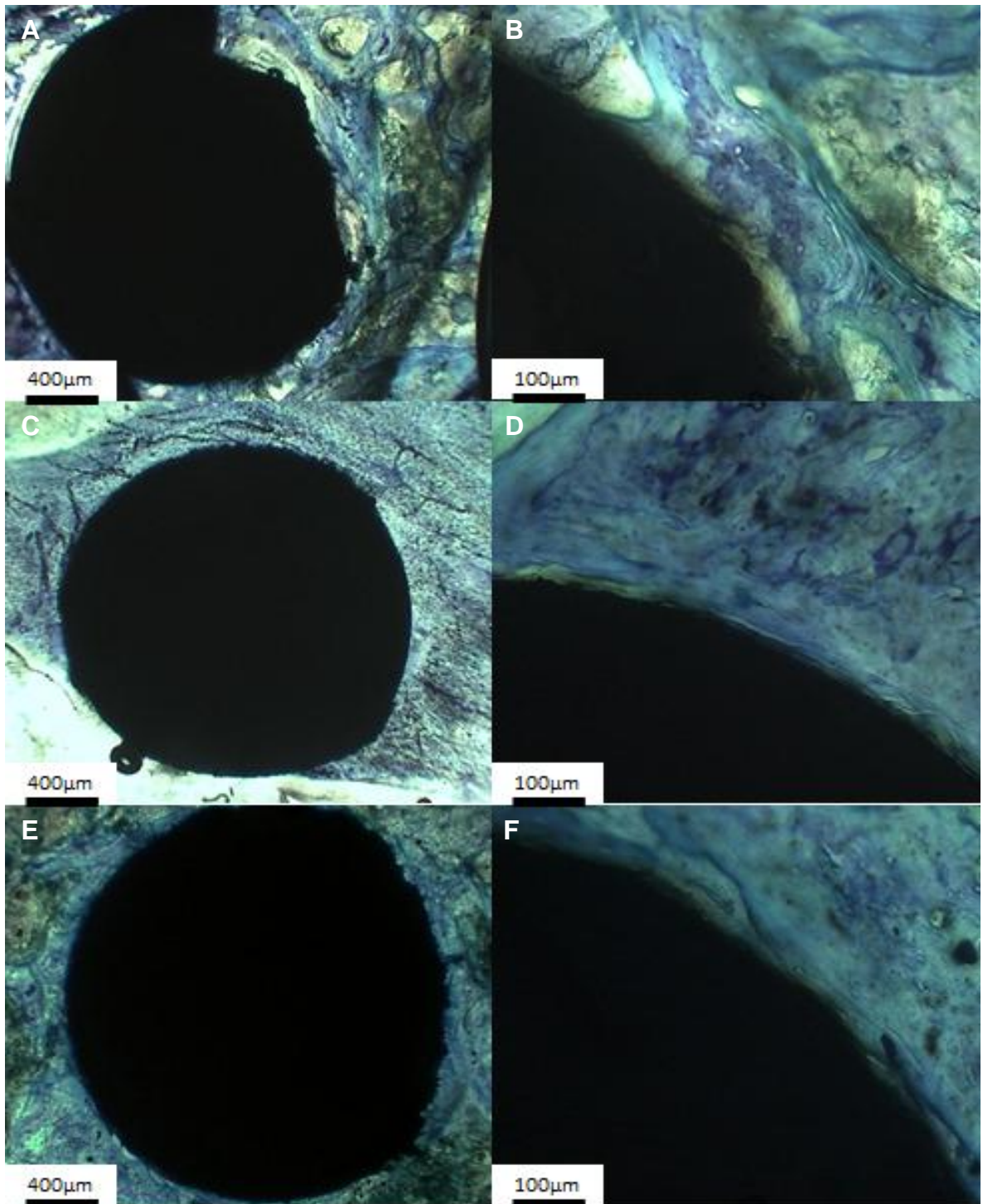


Figura 16: Imágenes de microscopía óptica de las muestras hueso/implante teñidas con azul de toluidina a las 6 semanas post-implantación. Muestras de implantes de titanio sin modificar (A y B), implante con recubrimiento nHA (C y D), implante con recubrimiento nBG (E, F). Magnificación 10X, 40X.

A las 6 semanas post-implantación (**Fig. 16**), las muestras histológicas presentan una conformación de tejido óseo más madura y completa en la periferia de los implantes. En las muestras con el implante de titanio sin modificaciones, hay una mayor ocupación del tejido óseo en la cercanía de su superficie, sin embargo se siguen apreciando gaps de un tamaño considerable en algunas zonas (mayores a 50 μm aproximadamente), además de sectores de la interfase con tejido fibroso y tejido óseo inmaduro. En las muestras de implantes con recubrimientos nanoestructurados cargados con las nanopartículas se observa una mayor y casi completa ocupación del contorno del implante con tejido óseo y osteoide. Se observa un halo azulado alrededor de la superficie, la cantidad de gaps nuevamente es considerablemente menor y de extensiones más pequeñas. Las muestras con recubrimiento cargado con nHA, muestran una mayor ocupación celular y menor cantidad de zonas con tejido fibroso en la interfase hueso/implante comparadas a las cargadas con nBG, y la cantidad de brechas es menor en comparación a su símil observado a las 3 semanas post-implantación. Con respecto a la muestra con el recubrimiento nanoestructurado cargado con nBG, el tejido óseo circundante se asemeja a la muestra de nHA en el mismo período post-implantación, pero se observa una mayor presencia y ocupación de hueso maduro en prácticamente toda la periferia del implante, con una mínima presencia de gaps en la interfase hueso/implante.

3. Caracterización vía microscopía electrónica BSE-SEM y análisis elemental EDX

Se seleccionaron las muestras del período de implantación de 3 semanas para ser observadas a otra escala mediante microscopía BSE-SEM y analizadas mediante EDX. Estas muestras fueron seleccionadas debido a que presentaron mayores diferencias entre los diferentes implantes utilizados (Ti, nHA y nBG) con respecto a la conformación del tejido óseo en la periferia del implante, y debido al interés de conocer la respuesta a períodos más cortos de implantación.

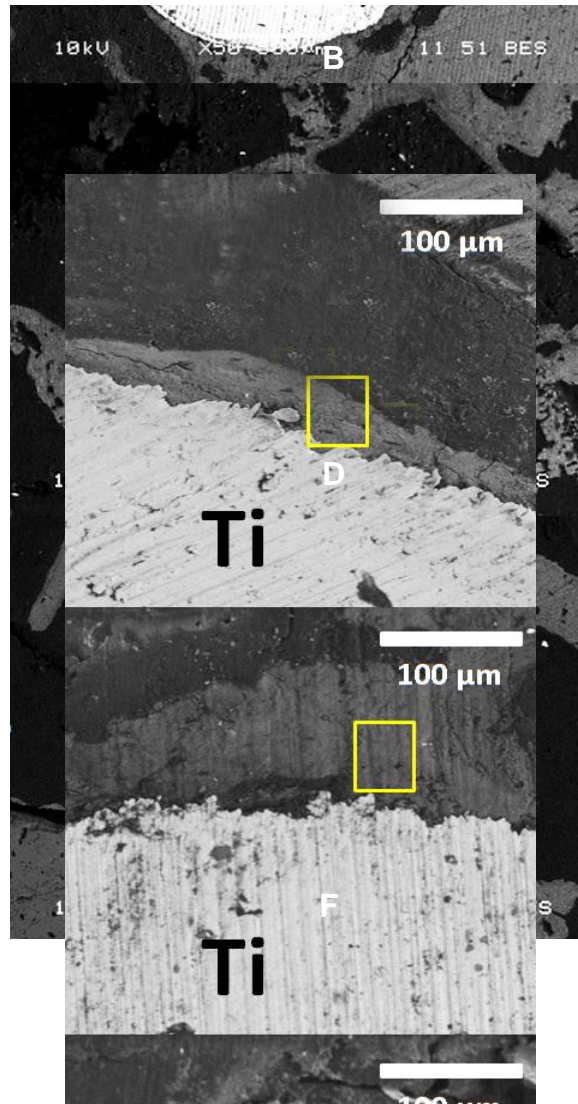


Figura 17: Imágenes de microscopía BSE-SEM de las muestras hueso/implante a las 3 semanas post-implantación. Muestra de implante con recubrimiento nBG (A y B), implante con recubrimiento nHA (C y D), implante de titanio sin modificar (E, F). Magnificación 50X y 250X.

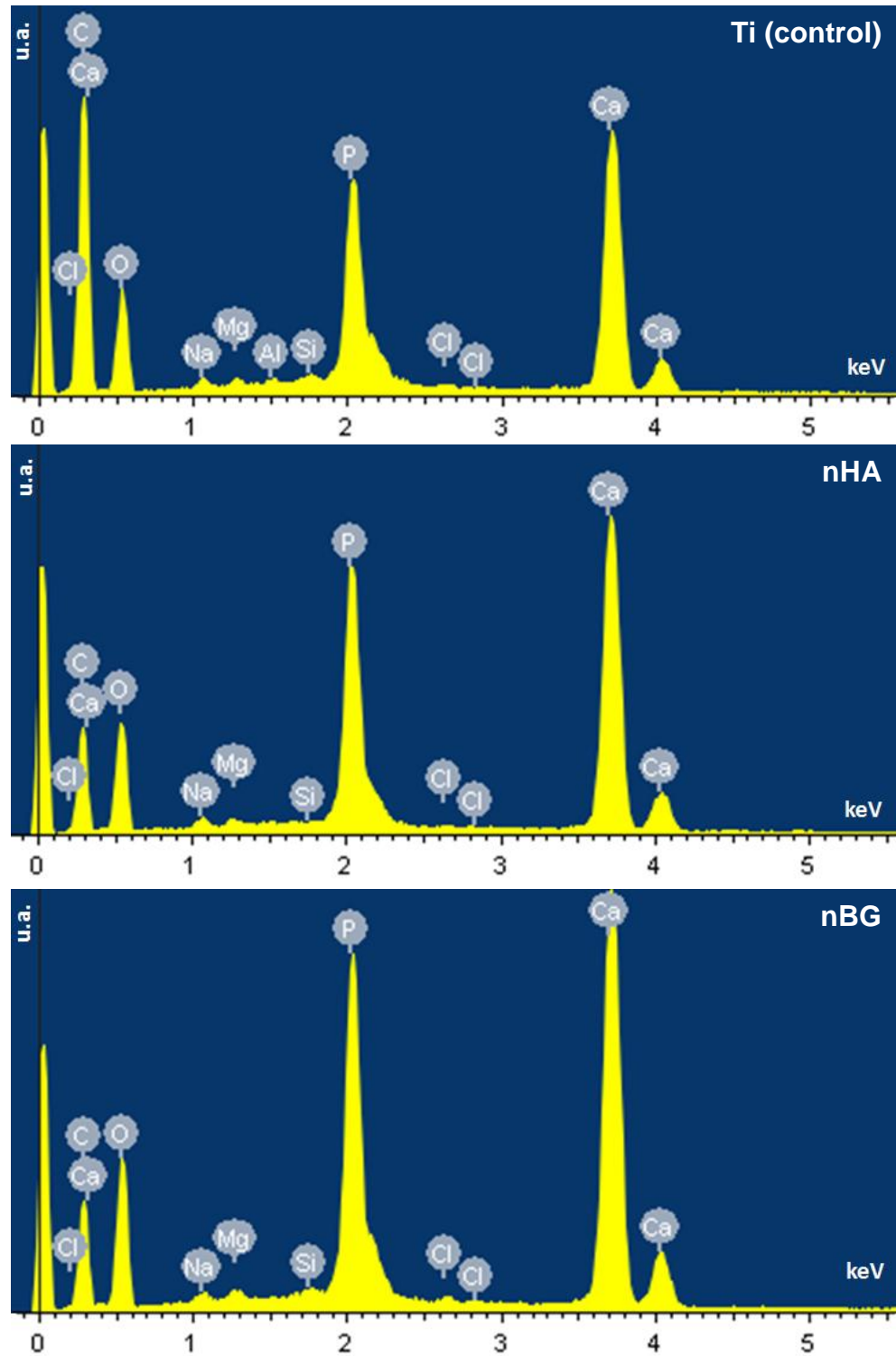


Figura 18: Espectros EDX correspondientes a las muestras hueso/implante a las 3 semanas post-implantación. En orden descendente: muestra de implante sin modificaciones, implante con recubrimiento nHA, implante con recubrimiento nBG.

En la **Figura 17**, se presentan las imágenes BSE-SEM de los 3 tipos de muestras obtenidas a las 3 semanas post implantación. Mediante esta técnica de contraste de fases, las zonas mineralizadas (densas) se observan como regiones de tonos más claros, mientras que el tejido blando se aprecia con una tonalidad de color oscuro (zonas de menor densidad). Al ser observadas a un aumento de 50X, la muestra de hueso/implante con recubrimiento nBG (**Fig. 17-A**) muestra una mayor presencia de tejido óseo mineralizado en la periferia del implante, seguida de la muestra nHA (**Fig. 17-C**) la cual también tiene tejido óseo maduro en casi todo su perímetro, pero con un grosor menor de tejido no mineralizado que la muestra nBG. Ambas muestras con recubrimiento nanoestructurado y nanopartículas presentaron una mayor ocupación de tejido óseo más denso alrededor de los implantes, al ser comparadas con la muestra que contiene el implante de titanio sin modificar (**Fig. 17-E**), incluso se visualizan zonas en el implante sin modificar que no exhiben material mineralizado en su contorno.

Al visualizar las muestras a mayor aumento (250X), se puede distinguir con buena resolución el nivel de oseointegración en la interfase hueso/implante. En la muestras de nBG (**Fig. 17-B**) el nivel de integración logrado genera una íntima unión entre el implante y el tejido mineral, sin brechas evidentes. En la muestra de nHA (**Fig. 17-D**), también se logran zonas con una alta unión entre la superficie del implante y el hueso, pero también se evidencian zonas con presencia de brechas de menor densidad que separan al implante del hueso maduro. En la muestra del titanio sin modificar (**Fig. 17-F**), la presencia de brechas y de zonas de la interfase sin tejido mineral es más evidente y extensa. Además el tejido óseo circundante al implante se aprecia menos consolidado y continuo que en las muestras con recubrimiento nanoestructurado. Las zonas marcadas con rectángulos amarillos en las imágenes corresponden a los sectores en que se realizó el análisis EDX.

El espectro EDX de las muestras se presenta en la **Figura 18**, el cual muestra los elementos predominantes de cada sector analizado. En las 3 muestras analizadas predominan los elementos Ca y P, componentes mayoritarios del tejido óseo mineralizado. Sin embargo, la intensidad de las señales en cada gráfico es diferente. Las señales más intensas de Ca y P fueron obtenidas en la

muestra de hueso/implante con recubrimiento nBG, seguido por la muestra del recubrimiento nHA. La muestra con menor proporción de estos elementos fue la del implante de titanio sin modificar. Este resultado también es evidenciado por la composición porcentual de estos elementos (**Tabla N° 2**). El porcentaje en peso de los elementos Ca y P es superior en la muestra ósea formada sobre la superficie con nBG, los valores porcentuales para la muestra nHA son levemente menores (~1%) y el porcentaje de estos elementos químicos en la muestra del implante sin modificación superficial es considerablemente menor que en las muestras con recubrimiento. Por otro lado, el contenido de C es también menor en los tejidos formados sobre los recubrimientos, lo cual puede relacionarse con una menor proporción de tejido blando.

ELEMENTO	% Peso en BG	% Peso en nHA	% Peso en Ti
Ca	22,28	21,19	14,14
P	11,20	10,76	6,47
C	25,71	29,63	49,73
O	39,46	37,25	28,45
Na	0,51	0,68	0,49
Mg	0,39	0,36	0,24
Al	0	0	0,14
Si	0,20	0	0,20
Cl	0,26	0,13	0,13

Tabla 2: Análisis porcentual de elementos en la interfase hueso/implante de las muestras 3 semanas post-implantación mediante EDX.

DISCUSIÓN

Usando la técnica “sol-gel” de autoensamblaje inducido por evaporación (EISA), fue posible incorporar recubrimientos de sílice nanoporoso cargados con nanopartículas bioactivas de nHA y nBG sobre la superficie de implantes de titanio comerciales. Esta técnica permite la elaboración de estructuras con un alto control arquitectónico a nivel nanométrico. En un trabajo anterior, enmarcado en este mismo proyecto (Valenzuela, 2012), se logró la preparación y la aplicación de estos recubrimientos sobre superficies planas de aleación de titanio (Ti6Al4V), material similar al usado en los implantes convencionales. En este trabajo se logró revestir micro-implantes comerciales con este recubrimiento bioactivo, que debido a su forma podían traer complicaciones durante el procedimiento (superficies curvas e irregulares), pero la caracterización mediante microscopía SEM de estos implantes demostró que los recubrimientos cargados con nHA y nBG fueron continuos y relativamente libres de microdefectos en prácticamente toda la superficie activa del implante (zona que toma contacto con el hueso luego de la implantación). Por lo que la geometría del implante no debería ser un impedimento para la fabricación de estos recubrimientos nanoestructurados sobre su superficie. El análisis de la estructura de los recubrimientos mediante microscopía HR-TEM demostró que estas películas cargadas con nanopartículas bioactivas mantienen su estructura nanoporosa altamente ordenada luego de su preparación sobre los implantes de titanio.

El modelo experimental *in vivo* usado para este trabajo permitió una correcta observación de la oseointegración lograda por los implantes. El procedimiento de implantación en los animales se logró realizar sin complicaciones, la técnica de inserción de los implantes en el hueso (*flapless*) resultó ser efectiva y rápida, lo que disminuyó el tiempo operatorio y el nivel de invasividad de la cirugía. Este procedimiento más el manejo anestésico, la analgesia post-implantación y el cuidado durante el período de implantación, evitaron la pérdida de alguno de los animales intervenidos y les brindaron un mínimo nivel de ansiedad.

El grado de oseointegración logrado por cada una de las muestras puede ser analizado desde varias aristas. En primer lugar, los implantes con los recubrimientos bioactivos nanoestructurados mostraron una marcada superioridad por sobre los implantes de titanio sin modificación. Este hecho está basado en el grado de ocupación de tejido óseo en la periferia de los implantes, tanto en el grupo de muestras a las 3 semanas como en el de las 6 semanas post-implantación. En los implantes de titanio sin modificar, no existe una consolidación definida del hueso en su perímetro, esta irregularidad del tejido circundante puede deberse a un proceso de remodelación ósea presente en esas zonas, la cual no ocurre al mismo ritmo que en los recubrimientos nanoporosos cargados con partículas bioactivas. En estos implantes modificados, su superficie posee una relación más íntima con el tejido óseo circundante. Además la cantidad de brechas (gaps) que poseen los implantes recubiertos es de un grosor y una extensión mínima, lo cual favorece que no existan zonas que puedan ser ocupadas por tejido blando y que posteriormente puedan ejercer micromovilidad de los implantes dentales. Al analizar la interfase hueso/implante mediante la microscopía BSE-SEM, también se corroboró que los recubrimientos bioactivos generaron una alta unión con el tejido óseo, el tamaño y extensión de gaps fue mínimo. En la muestra cargada con el recubrimiento nBG se observó una mejor calidad en la consolidación del tejido mineralizado en la interfase, y las brechas son prácticamente imperceptibles.

La calidad del tejido óseo también es un elemento importante en el análisis de la oseointegración. La mejor calidad de hueso obtenida en las muestras con recubrimiento en sus implantes se evidencia en la microscopía óptica y en el microanálisis EDX. La intensidad en la coloración del tejido circundante al implante es mayor en las muestras de nHA y nBG, lo cual indica un mayor nivel de mineralización y madurez del hueso que en las muestras sin recubrimiento. Al observar las muestras de 3 semanas post-implantación a un mayor aumento se aprecian diferencias entre los recubrimientos bioactivos. En este punto toma ventaja el recubrimiento nBG, ya que la intensidad del color azul (tejido mineralizado) fue mayor en el recubrimiento cargado con partículas de vidrio

bioactivo, esto indica que la velocidad de maduración ósea de este recubrimiento es mayor. En las muestras cargadas con nHA se observa una marcada presencia celular en la matriz ósea en proceso de mineralización, que correspondería a células osteogénicas en la interfase hueso-implante. Si analizamos los espectros EDX y el porcentaje en peso de los elementos presentes en la interfase hueso/implante a las 3 semanas post-implantación, la proporción de calcio y fosfato encontrada en los tejidos formados sobre los recubrimientos cargados con nanopartículas fue mayor que en el implante sin modificar, donde el que obtuvo las mayores señales de estos elementos fue el recubrimiento nBG (Ca=22,28 %, P=11,20 %).

Al comparar el estado de oseointegración entre las muestras de 3 y 6 semanas post-implantación, resalta la rápida formación de tejido óseo peri-implantar en las muestras de 3 semanas que recibieron el recubrimiento nanoestructurado, especialmente observado en el recubrimiento nBG. Este efecto temprano de consolidación ósea en las muestras puede ofrecer la ventaja de evitar la micromovilidad y la presencia de brechas entre los implantes dentales y el tejido circundante en los inicios del tratamiento, tiempo en que se produce la mayoría de los fracasos implantológicos, estas microbrechas son rápidamente ocupadas por tejido no calcificado (tejido fibroso) y evitan que se consolide con hueso la interfase tejido/implante, además estos espacios facilitan la colonización por patógenos que pueden generar inflamación y posteriormente la pérdida del implante. Todas estas desventajas se evitan logrando una rápida formación de tejido óseo mineralizado en la interfase, efecto que es logrado por el recubrimiento nBG. A las 6 semanas post-implantación, las muestras de tejido con implantes recubiertos presentaron una disposición similar de tejido óseo maduro en la periferia del implante, lo cual implica que se logra una óptima unión con el implante usando ambos recubrimientos.

La superioridad de los recubrimientos nanoestructurados cargados con nanopartículas bioactivas de nBG y nHA, concuerda con los hallazgos obtenidos en los análisis de bioactividad *in vitro* de estos recubrimientos (Valenzuela, 2012). Estas propiedades mejoradas se pueden explicar por las características de estos

materiales. La estructura porosa y ordenada de los recubrimientos de sílice favorece la mineralización de apatita sobre la superficie de los implantes de titanio. Este efecto es potenciado dramáticamente cuando se incorporan nanopartículas de materiales osteoconductores y osteoinductores como lo es la hidroxiapatita y el vidrio bioactivo, observándose una mayor cantidad y extensión de la mineralización sobre la superficie. La causa de esto es la capacidad de las nanopartículas bioactivas (especialmente de nBG) para inducir la mineralización en un medio fisiológico. Otra propiedad de estos recubrimientos es que favorecen notoriamente la adsorción de proteínas, esto debido a la alta superficie específica atribuida a su nanoestructura y a la presencia de las nanopartículas bioactivas, lo que da a las proteínas una mayor cantidad de sitios disponibles para ser adsorbidas. Consecuentemente, la mayor adsorción de proteínas aceleran la adhesión de células osteoblásticas a la superficie de los implantes y promueven la diferenciación de células mesenquimáticas a osteoblastos. Estas respuestas celulares son atribuidas a un efecto indirecto dado por la alta adsorción de proteínas observada en la amplia superficie otorgada por los recubrimientos nanoporosos, pero también es probable que se deba a un estímulo mecánico directo de la topografía nanoestructurada con la superficie celular. Adicionalmente son conocidos los mecanismos por los cuales el vidrio bioactivo estimula la diferenciación osteogénica de células mesenquimáticas en células osteoblásticas generadoras de nuevo tejido óseo. Este efecto podría verse acentuado considerando las partículas de BG con tamaño nanométrico utilizadas en este trabajo. Todas estas ventajas observadas *in vitro* fueron verificadas en este trabajo *in vivo*, por lo que la aplicación de los recubrimientos bioactivos nanoestructurados puede ser una alternativa para mejorar las propiedades de oseointegración de los implantes dentales, especialmente el recubrimiento nanoporoso cargado con nanopartículas de nBG, el cual presentó los mejores resultados.

CONCLUSIONES

1. Mediante el método EISA sol/gel, es posible conseguir recubrimientos nanoporosos a base de sílice y cargados con nanopartículas bioactivas de hidroxiapatita sintética (nHA) y vidrio bioactivo (nBG) sobre la superficie de microimplantes de titanio comerciales. Estos recubrimientos demostraron ser continuos y libres de defectos.
2. La implementación de un modelo animal, basado en la inserción de un microimplante en la metáfisis proximal de la tibia de una rata, permite evaluar el grado de oseointegración lograda por implantes dentales cargados con recubrimientos bioactivos nanoestructurados.
3. Los implantes con recubrimientos nanoporosos y cargados con nanopartículas bioactivas de nBG y nHA, al ser comparados con implantes de titanio sin modificación superficial, logran una unión más íntima con el tejido óseo circundante, mayor grado de mineralización del tejido óseo neoformado en la periferia de los implantes y una menor cantidad de defectos (gaps) en la interfase hueso/implante.
4. El recubrimiento cargado con nanopartículas de nBG fue el que logró los mejores resultados con respecto a la velocidad de formación, grado de mineralización y cantidad de hueso maduro formado alrededor de los implantes. Esta favorable respuesta se atribuye a las propiedades osteogénicas de la nanotopografía porosa del recubrimiento así como de las nanopartículas bioactivas incorporadas.

5. Los recubrimientos nanoestructurados cargados con nanopartículas bioactivas aceleraron el crecimiento y la consolidación del tejido óseo peri-implantar, obteniéndose hueso maduro y bien asentado en la interfase a las primeras semanas post-implantación. Este hecho tiene implicancia clínica ya que permitiría prevenir la micromovilidad temprana y reduciría la posibilidad de ocupación de tejido fibroso que limite el correcto asentamiento del hueso en la superficie de los implantes, aumentando de este modo el éxito clínico de este tipo de rehabilitaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abron A, Hopfensperger M, Thompson J, Cooper LF (2001). Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *The Journal of prosthetic dentistry* 85(1):40-46.

Albrektsson TW, A (2004). Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *The International journal of prosthodontics* 17(5):544-564.

Bagshaw SP, E; Pinnavaia, T (1995). Templating of mesoporous molecular sieves by non ionic polyethylene oxide surfactants. *Science* 269(1242).

Balasundaram G SM, Webster TJ (2006). Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials* 27(2798–2805).

Ballarre J, Manjubala I, Schreiner WH, Orellano JC, Fratzi P, Cere S (2010). Improving the osteointegration and bone-implant interface by incorporation of bioactive particles in sol-gel coatings of stainless steel implants. *Acta biomaterialia* 6(4):1601-1609.

Bayounis AM, Alzoman HA, Jansen JA, Babay N (2011). Healing of peri-implant tissues after flapless and flapped implant installation. *Journal of clinical periodontology* 38(8):754-761.

Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J (2003). De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical oral implants research* 14(3):251-262.

Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A (1969). Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery* 3(2):81-100.

Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O *et al.* (1977). Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery Supplementum* 16(1-132).

Brinker CJ SG (1990). Sol-gel science San Diego, CA: Academic Press.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H (1991). Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of biomedical materials research* 25(7):889-902.

Buser D, Brogini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL *et al.* (2004). Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal of dental research* 83(7):529-533.

C. J. Brinker YL, A. Sellinger, H. Fan (1999). Evaporation-Induced SelfAssembly: Nanostructures Made Easy. *Adv Mater* 11(577-585).

Carlsson LV, Albrektsson BE, Albrektsson BG, Albrektsson TO, Jacobsson CM, Macdonald W *et al.* (2006). Stepwise introduction of a bone-conserving osseointegrated hip arthroplasty using RSA and a randomized study: I. Preliminary investigations--52 patients followed for 3 years. *Acta orthopaedica* 77(4):549-558.

Cochran DL (1999). A comparison of endosseous dental implant surfaces. *Journal of periodontology* 70(12):1523-1539.

Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A *et al.* (2006). Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials* 27(6):926-936.

Diefenbeck M, Muckley T, Schrader C, Schmidt J, Zankovych S, Bossert J *et al.* (2011). The effect of plasma chemical oxidation of titanium alloy on bone-implant contact in rats. *Biomaterials* 32(32):8041-8047.

Duran A CA, Gomez Coedo A, Dorado T, Garcia C, Cere S (2004). Sol-gel coatings for protection and bioactivation of metals used in orthopaedic devices. *J Mater Chem* 14(2282– 2290).

Filiaggi MJ, Pilliar RM, Yakubovich R, Shapiro G (1996). Evaluating sol-gel ceramic thin films for metal implant applications. I. Processing and structure of zirconia films on Ti-6Al-4V. *Journal of biomedical materials research* 33(4):225-238.

Fratzl P GH, Paschalis P, Roschger P (2004). Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem* 14(2115–2123).

Gallardo J GP, Durán A (2001). Bioactive and protective sol-gel coatings on metals for orthopaedic prostheses. *Sol-Gel Sci Technol* 21(65–74).

Galliano P dDJ, Pascual MJ, Durán A (1998). Sol-gel coatings on 316L steel for clinical applications. *J Sol-Gel Sci Technol* 13(723–727).

Gotfredsen K, Hjorting-Hansen E, Budtz-Jorgensen E (1990). Clinical and radiographic evaluation of submerged and nonsubmerged implants in monkeys. *The International journal of prosthodontics* 3(5):463-469.

Hamadouche M, Meunier A, Greenspan DC, Blanchat C, Zhong JP, La Torre GP *et al.* (2001). Long-term in vivo bioactivity and degradability of bulk sol-gel bioactive glasses. *Journal of biomedical materials research* 54(4):560-566.

Hench L (1991). Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 74(1487-1510).

Hench L (2009). Genetic design of bioactive glass. *Journal of European Ceramic Society* 29(1257-1265).

Hobo SI, E.; Garcia, L. (1990). Osseointegration and occlusal rehabilitation Tokyo: Quintessence Publishing.

Hong Z LL, Chen L, Chen X, Ping X (2009). Preparation of bioactive glass ceramic nanoparticles by combination of sol-gel and coprecipitation method *Journal of Non-Crystalline Solids* 355(6):368–372.

Inzunza DC, C; Von Marttens, A; Leighton, Y; Carvajal, JC; Valenzuela, F; y cols. (2012). Synthesis of nanostructured porous silica coatings on titanium and their cell-adhesive and osteogenic differentiation properties. *Journal of biomedical materials research* En prensa, aceptado (2012)

Jeong SM, Choi BH, Li J, Kim HS, Ko CY, Jung JH *et al.* (2007). Flapless implant surgery: an experimental study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 104(1):24-28.

Jeong SM CB, Xuan F, Kim HR (2012). Flapless implant surgery using a mini-incision. *Clinical implant dentistry and related research* 14(74-79).

Jones JR, Sepulveda P, Hench LL (2001). Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. *Journal of biomedical materials research* 58(6):720-726.

Jones JR, Ehrenfried LM, Hench LL (2006). Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27(7):964-973.

Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA (2009). Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research* 20 Suppl 4(185-206).

K.P. Sanosh M-CC, A. Balakrishnan, Y. Lee a, T.N. Kim, S. Cho (2009). Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition. *Current Applied Physics* 9(1459–1462).

Keller JC, Schneider GB, Stanford CM, Kellogg B (2003). Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant dentistry* 12(2):175-181.

Kresge Cea (1992). Ordered mesoporus molecular sieves syntesyzed by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* 359(710-712).

Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 23(7):844-854.

Liu A, Hong Z, Zhuang X, Chen X, Cui Y, Liu Y *et al.* (2008). Surface modification of bioactive glass nanoparticles and the mechanical and biological properties of poly(L-lactide) composites. *Acta biomaterialia* 4(4):1005-1015.

Masuda T SG, Offenbacher S, Felton DA, Cooper L. (1997). Cell and matrix reactions at titanium implants in surgically prepared rat tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12(4):472-485.

Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, Cooper LF (2008). Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials* 29(28):3822-3835.

Meng J, Zhu G, Xu H (2007). [Effects of nanotopography for biomaterials on cell behaviors]. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi* 24(3):685-689.

Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S *et al.* (1998). Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *Journal of biomedical materials research* 40(2):324-335.

National Aeronautics and Space Administration N Nanotechnology. <http://www.ipt.arc.nasa.gov/nanotechnology.html>, fecha de acceso 18-01-2013.

Ogawa T, Nishimura I (2003). Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18(2):200-210.

Ostman PO (2008). Immediate/early loading of dental implants. Clinical documentation and presentation of a treatment concept. *Periodontology 2000* 47(90-112).

Ostomel TA, Shi Q, Tsung CK, Liang H, Stucky GD (2006). Spherical bioactive glass with enhanced rates of hydroxyapatite deposition and hemostatic activity. *Small* 2(11):1261-1265.

Park GE WT (2005). A Review of Nanotechnology for the Development of Better Orthopedic Implants. *J Biomed Nanotechnol* 1(18-29).

Parkhill RL KE, Donley MS (2001). Application and evaluation of environmentally compliant spray-coated ormosil films as corrosion resistant treatments for aluminum. *Prog Org Coat* 41(261-265).

Peris J. L PJ, Comin M, Dejoz R, Roger I, Vera P. (1993). Técnica histológica para la inclusión en metil-metacrilato de muestras óseas no descalcificadas *Rev Esp Cir Osteoart* 28(231-238)

Ricci JL CJ, Frenkel SR, Chang R, Nadkarni P, Turner J, et al. (2000). Bone response to laser microtextured surfaces Toronto: Em2 Inc.

Rodriguez Reyes M (2008). Síntesis, caracterización y evaluación bioactiva de híbridos base siloxanocon diferentes contenidos de TiO₂ y CaO., Instituto Politécnico Nacional.

Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J *et al.* (2003). Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *Journal of dental research* 82(5):372-376.

Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen JA, Creugers NH (2006). Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *Journal of dental research* 85(6):496-500.

Soler-Illia ea (2006). Functionalized mesoporous hybrid thin films as selective membranes. *Adv Mater* 18(934).

Stanford CM JG, Fakhry A, Gratton D, Mellonig JT, Wanger W (2006). Outcomes of a fluoride modified implant one year after loading in the posterior-maxilla when placed with the osteotome surgical technique. *Appl Osseointegr Res* 5(50-55).

Tomsia AP LM, Lee JS, Mankani MH, Wegst UG, Saiz E (2011). Nanotechnology Approaches for Better Dental Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 26(Suppl)(25–49).

Valenzuela F (2012). Preparación de recubrimientos nanoestructurados para la oseointegración de superficies de titanio. Trabajo de investigación para optar al título de Químico Industrial, Universidad Tecnológica Metropolitana).

Valenzuela F, Covarrubias C, Martinez C, Smith P, Diaz-Dosque M, Yazdani-Pedram M (2012). Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 100(6):1672-1682.

Valerio P, Guimaraes MH, Pereira MM, Leite MF, Goes AM (2005). Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foams. *Journal of materials science Materials in medicine* 16(9):851-856.

Vandamme K, Holy X, Bensidhoum M, Logeart-Avrarmoglou D, Naert IE, Duyck JA *et al.* (2011). In vivo molecular evidence of delayed titanium implant osseointegration in compromised bone. *Biomaterials* 32(14):3547-3554.

Webster TJ, Siegel RW, Bizios R (1999). Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials* 20(13):1221-1227.

Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R (2000a). Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 21(17):1803-1810.

Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R (2000b). Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of biomedical materials research* 51(3):475-483.

Webster TJ, Ejiófor JU (2004). Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials* 25(19):4731-4739.

Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S (1998). A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clinical oral implants research* 9(1):11-19.

Wilson-Hench L (1987). Osteoinduction. In: Definitions in biomaterials, Progress in biomedical engineering. W DF editor. Amsterdam: Elsevier.

Worthington P (2003). Introduction: history of implants. In: Osseointegration in dentistry: an overview. PL Worthington, BR; Rubenstein, JE editor. Illinois: Quintessence Publishing, pp. 2.

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM (2000). Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochemical and biophysical research communications* 276(2):461-465.

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM (2001). Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *Journal of biomedical materials research* 55(2):151-157.

Y. Lu RG, C. A. Drewlen, M. T. Anderson, C. J. Brinker, W. Gong y cols (1997). Continuous formation of supported cubic and hexagonal mesoporous films by sol-gel dip-coating. *Nature* 389(364-368).

Yunfeng LGRAD, C; Anderson, MT; Brinker, CJ; Gong, W, et al (1997). Continuous formation of supported cubic and hexagonal mesoporous films by sol-gel dip-coating. *Nature* 389(364-368).

Zhao G, Zinger O, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan BD (2006). Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clinical oral implants research* 17(3):258-264.

Zhong J, Greenspan DC (2000). Processing and properties of sol-gel bioactive glasses. *Journal of biomedical materials research* 53(6):694-701.

Zhou J, Chang C, Zhang R, Zhang L (2007). Hydrogels prepared from unsubstituted cellulose in NaOH/urea aqueous solution. *Macromolecular bioscience* 7(6):804-809.

ANEXOS

ANEXO N°1: CARTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITE DE BIOETICA SOBRE
INVESTIGACION EN ANIMALES

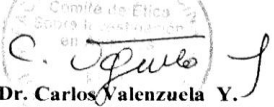
CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: *“Evaluación in vivo de la oseointegración de implantes dentales modificados con recubrimientos bioactivos nanoestructurados, usando un modelo de rata”* cuyos investigadores responsables son los **Drs. Cristian Covarrubias G y Alfredo Von Martens C.**, no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA# 0512 FMUCH).

Los Drs Covarrubias y Von Martens se han comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto de tesis de Pregrado del Sr Matías Mattmann.

El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO” después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.


 Dr. Carlos Valenzuela Y.
 Presidente

Santiago, 12 de Junio de 2012