



UNC

Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA RESPUESTA OSEA
POR EFECTO DE LA DESINFECCION DE IMPLANTES
LAMINARES EN UN MODELO EXPERIMENTAL”**

TESISTA:

OD. ALEJANDRO JORGE FILSINGER

DIRECTOR:

PROF. DR. MARÍA ELENA GONZÁLEZ DE CROSA

CÓRDOBA, 2005



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



**“CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA
RESPUESTA ÓSEA POR EFECTO DE LA
DESINFECCIÓN DE IMPLANTES LAMINARES
EN UN MODELO EXPERIMENTAL”**

Trabajo de Tesis para optar al título de

Doctor en Odontología

Odontólogo Alejandro Jorge Filsinger

Año 2005



“Yo les doy vida eterna y jamás perecerán ni nadie me los quitará”.

Jesús, La Biblia, Juan 10:28.

A mi querida Andreana....

Mi sentido y profundo agradecimiento a todos aquellos que directa o indirectamente me apoyaron y alentaron posibilitando la realización de este trabajo.

A mi Directora de Tesis Profesora Doctora Marta Elena Gonzalez de Crosa, sus conocimientos y su gran experiencia en ciencia me transmitieron claridad en lo que estaba haciendo y un profundo interés en la investigación, agradezco su estímulo permanente a aprender a saber hacer todo lo que esté a mi alcance, a pesar de mi mentalidad clínica, gracias por confiar en mí. Su ejemplo, su amistad y su apoyo en momentos tan difíciles como los que me tocaron vivir siempre estarán conmigo...

Al Profesor Doctor Luis Augusto Olmedo por su profesionalismo y la capacidad depositada desinteresadamente en este trabajo, su participación me transmitió una visión de la microbiología clínica y práctica que no conocía, agradezco profundamente sus ideas y lineamientos.

A la Ingeniera Karim Alejandra Nemer Pelliza, su dedicación y sus conocimientos fueron de gran importancia en la realización de este trabajo, mi sincero reconocimiento por su participación y asesoramiento.

A la Doctora Mabel Noemí Brunotto por su invaluable aporte en la bioestadística del trabajo, sus oportunas sugerencias, su profesionalismo y su disponibilidad desinteresada nunca podré olvidar.

Al Doctor Luis Mario Plavnik por sus sugerencias, su aporte crítico y por su abierta predisposición a colaborar en esta tesis, gracias por los momentos que compartimos con este pretexto.

Al Doctor Daniel Olmedo por compartir sus experiencias en ésta área y al Odontólogo Sebastián Fontana, mi compañero en el área quirúrgica del ABO con quién compartimos tiempo y esfuerzos.

A la Profesora Doctora María Beatriz Guglielmotti por sus consejos y sugerencias al comenzar este trabajo y por abrirme las puertas de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires.

A la Comisión Directiva del Área de Biología Oral por haberme permitido trabajar en sus instalaciones.

A las autoridades del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba por permitirme trabajar con el Bioterio.

Al Profesor Doctor Rubén Rosemberg del Brånemark Osseointegration Center de Santiago, Chile por su amistad y por compartir desinteresadamente su experiencia clínica y conocimientos en implantología. Mi profundo reconocimiento por abrirme las puertas de su tan prestigioso centro.

Al Odontólogo Marcelo Goloboff por su amistad y por compartir momentos inolvidables de la especialidad.

A mis hijos Andreana y Max, por regalarme para esto tiempo que quizás sea de ellos y a mis padres Jorge y Dinchen que ocuparon algunos de los espacios que no he podido llenar.

Dios bendiga ricamente a todos...





INDICE GENERAL

	Pag.Nº
Introducción/Antecedentes bibliográficos.....	3
Objetivos.....	13
Material y Métodos.....	14
Resultados Histológicos/Histomorfométricos.....	30
Discusión.....	49
Conclusiones.....	56
Resumen.....	57
Bibliografía.....	59



INTRODUCCIÓN / ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La predictibilidad en la rehabilitación de pacientes edéntulos parciales o totales tratados con implantes dentales oseointegrados ha sido confirmada científicamente como una modalidad de tratamiento en la última mitad del siglo pasado (1, 2, 3).

La capacidad del titanio para desarrollar un firme anclaje en el hueso sin interposición de tejido blando ha permitido asegurar la estabilidad y longevidad de los implantes destinados a retener elementos dentarios artificiales con respecto a otros materiales utilizados con la misma finalidad (1, 2).

También se ha podido comprobar una íntima relación entre el hueso vivo y la superficie del titanio, responsable del alto nivel de éxito que es posible alcanzar en nuestros tiempos (4, 5).

Para comprender el proceso de oseointegración como una respuesta del tejido óseo frente al efecto de implantes de titanio, consideramos pertinente presentar algunos aspectos elementales de la estructura del aparato de sostén de los elementos dentarios fundamentalmente los componentes del tejido óseo. El periodonto normal es una estructura compleja que incluye componentes morfológicos básicos que son encía, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento los cuales en conjunto relacionan los dientes con los huesos maxilares. Se trata de una estructura dinámica, que en estado de salud está sujeta a un ciclo estrictamente controlado de síntesis y degradación. Este delicado balance del “turnover” es permanentemente desafiado por la acumulación de bacterias en la superficie dentaria que en exceso pueden desencadenar una reacción inflamatoria como respuesta defensiva. Esta situación puede superar la homeostasis dentro del periodonto conduciendo primero a una gingivitis y luego a una

periodontitis. En estas formas de enfermedad periodontal ocurre una degradación de las proteínas de los tejidos conectivos, tanto del ligamento periodontal como del hueso alveolar, que puede ser considerada como el resultado de una proteólisis local descontrolada (6).

Además de los conceptos mencionados, complicaciones tales como la pérdida progresiva de hueso alrededor de implantes dentales en funcionamiento ponen en riesgo el pronóstico a largo plazo de los implantes y prótesis implanto-soportadas. Esta pérdida ósea comienza en la porción coronal del implante mientras la porción apical mantiene el contacto implante-hueso, es decir que desde el punto de vista clínico el implante no tiene movilidad hasta que la pérdida ósea no involucra la superficie completa del implante. Varios estudios (7, 8, 9) han demostrado que los tejidos que rodean tanto a los elementos dentarios como a los implantes tienen muchas características en común, en particular en lo referente a la respuesta de estos tejidos en lesiones asociadas a placa bacteriana. Existen evidencias clínicas y radiográficas de que la destrucción tisular al avanzar apicalmente compromete el futuro de las fijaciones ^{8,10}. Esta reacción inflamatoria con pérdida del hueso de soporte en los tejidos que rodean a un implante en actividad es lo que Albrektsson e Isidor han definido en 1994 como peri-implantitis (10).

La microbiota asociada con implantes dentales fracasados es similar a la flora comúnmente asociada con dientes afectados periodontalmente tal como lo refieren Rams y colaboradores en 1984 y Mombelli y colaboradores en 1987 y además la principal causa de la peri-implantitis es la placa dental (11, 12, 13).

Los microorganismos Gram-negativos constituyen un alto porcentaje de la flora en periodontitis y peri- implantitis (12). Los mecanismos de virulencia de los

microorganismos pueden ser directos o indirectos. Dentro de los directos tenemos el daño de los tejidos, la invasión y la evasión o alteración de la respuesta del huésped. El daño tisular es producido por endotoxinas que inician el proceso inflamatorio mediante la activación del sistema de complemento por la vía alternativa, de los macrófagos, y del factor XII de Hagemann.

Por otro lado, las vesículas superficiales descritas en *Porphyromona gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* transportan factores de virulencia a distancia.

También debemos tener en cuenta la presencia de exoenzimas, metabolitos tóxicos y otros componentes citotóxicos (11,14). En lo referido a las exoenzimas probablemente sea *Porphyromona gingivalis* la bacteria que produce mayor cantidad de enzimas y sea la de mayor interés por su acción biológica en el campo periodontal. Esta especie sintetiza gingivopainas que destruyen el colágeno del ligamento periodontal. Además, estas proteasas líticas activan precursores inactivos de metaloproteasas con la consiguiente destrucción tisular.

Porphyromona gingivalis junto a otras especies bacterianas elaboran además enzimas que agreden los tejidos como hialuronidasa, fosfatasa alcalina, condroitínsulfatasa, etc. o inactivan $\alpha 1$ macroglobulina y $\alpha 1$ antitripsina (14,15).

Los metabolitos tóxicos son producidos por un gran número de bacterias periodontopatógenas que elaboran y excretan productos como: ácido butírico y propiónico, indol, aminas, amoníaco y ácido sulfídrico. *Fusobacterium nucleatum* es la especie periodontal que produce más cantidad de ácido butírico y componentes volátiles del azufre. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Capnocytophaga spp.* son bacterias, que al menos “in vitro”, inhiben la proliferación de fibroblastos y por lo tanto la síntesis de colágeno y la reparación tisular (15,16).

Otro mecanismo directo de virulencia es la invasión, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* posee un mecanismo invasivo muy similar a otros patógenos intracelulares, donde tras el contacto con las células produce el borramiento de las microvellosidades y la formación de un “cráter” en su superficie (11, 15, 16, 17). La actina se reordena en el lugar de entrada, se termina construyendo una vacuola intracitoplasmática que se rompe con los microorganismos dentro los cuales, se multiplican, polimerizan la actina que se dispone en un extremo y propulsa las bacterias a través de los microtúbulos hasta la membrana plasmática y ésta protusiona contactando con la de otras células así como por procesos de fusión y fisión de membranas las invaden posteriormente.

Finalmente el tercer modo directo de virulencia son los mecanismos bacterianos de evasión inmune como por ejemplo la destrucción de los polimorfonucleares por leucotoxinas (algunas cepas de *A. actinomycetemcomitans* producen este tipo de exotoxina), la inhibición quimiotáctica de polimorfonucleares (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *Capnacidophaga spp.*), la activación de linfocitos T supresores y policlonal de linfocitos B (*A. actinomycetemcomitans*). Esto determina un déficit en la producción de anticuerpos, o que éstos, produzcan situaciones biológicas indeseables como por ejemplo formación de inmunocomplejos y fijación al complemento que sufrirá así una hiperactivación.

También se puede producir la inhibición de la proliferación de linfocitos B con déficit en la producción de anticuerpos (*P. melaninogénico* y *Prevotella spp.*).

Además podemos mencionar la acción tóxica sobre monocitos y linfocitos por acción de algunas especies bacterianas. Otros mecanismos que modifican el proceso de evasión son: disminución de la actividad de los radicales de oxígeno en las células

fagocíticas por superóxido dismutasa (*A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*), inhibición de la desgranulación lisosómica, y la unión a la inmunoglobulina por su porción Fc bloqueando la fagocitosis dependiente de opsininas (*A. actinomycetemcomitans*) (14, 15, 16).

La virulencia bacteriana también puede actuar por mecanismos indirectos, "aspecto" relacionado a la capacidad de los antígenos y bacterias de inducir un proceso inflamatorio, en donde el microorganismo gatilla una respuesta inmunológica y ésta es la que produce el daño tisular. La hipersensibilidad básicamente conduce a la inflamación, daño tisular y reabsorción ósea (14).

Una suposición válida es que en estas circunstancias la superficie de un implante expuesta a los patógenos periodontales podría actuar como inhibidor de la reparación (18, 19,20). La regeneración del hueso perdido por enfermedad periodontal requiere de un proceso coordinado y simultáneo de los tejidos periodontales en un medio ambiente con actividad inflamatoria. En el caso de la instalación de implantes dentales la integración del hueso formado "*de novo*" a la superficie del implante introduce una situación diferente relacionada con las características fisicoquímicas de la superficie del implante (21).

Así como una periodontitis no tratada puede llevar a la pérdida de dientes naturales, un proceso patológico como la peri-implantitis puede conducir a la pérdida de implantes dentales. Existen datos científicos que señalan a la placa bacteriana como el factor etiológico primario en la pérdida de dientes e implantes (17, 22). Tal como se ha demostrado en la periodontitis alrededor de dientes naturales, hallazgos clínicos alrededor de implantes fracasados muestran una marcada inflamación gingival, profundidad de bolsa y pérdida ósea progresiva (22). Clínicamente el método

probado y de elección para cubrir las superficies implantarias expuestas es la regeneración ósea guiada cuyo éxito depende tanto de la característica superficial del implante como de su desinfección (23, 24).

Para lograr resultados exitosos mediante técnicas regenerativas es crítico remover contaminantes y bacterias asociadas a la superficie expuesta del implante a fluidos corporales, tejidos blandos adyacentes y saliva que facilitan la adherencia bacteriana (25). Diversas técnicas de tratamiento se han propuesto en la clínica implantaria. En 1992 Lehmann y colaboradores presentaron la aplicación de regeneración ósea guiada combinada con la desinfección de la superficie implantaria en un paciente con peri-implantitis(26). Los implantes pudieron ser recuperados y utilizados para retener un puente fijo sobre implantes gracias a la desinfección con clorhexidine de la superficie implantaria, utilización de una membrana de e-PTFE (poly-tetra-fluor etileno) y terapia antibiótica. En el mismo año Lindhe y colaboradores mediante la utilización de un modelo experimental en perros beagle colocaron ligaduras de algodón subgingivalmente para desarrollar la formación de placa bacteriana en implantes y dientes (8). Esta situación experimental indujo peri-implantitis y periodontitis por contaminación de las superficies implantarias desarrollando defectos estructurales en el tejido óseo. Otros autores (27) utilizaron el mismo modelo experimental para recuperar los implantes con pérdida ósea por medio de regeneración ósea guiada pero sin tener en cuenta la desinfección de las superficies implantarias. Estos autores concluyeron que para el tratamiento de la peri-implantitis la regeneración ósea guiada no resulta un procedimiento terapéutico predecible para mejorar los parámetros clínicos o regenerar nuevo hueso alrededor de implantes afectados con peri-implantitis. Jovanovic y colaboradores llegaron un poco más

lejos aplicando en el mismo modelo regeneración ósea guiada con membranas de e-PTFE acompañada con un tratamiento desinfectante con aire polvo abrasivo y la aplicación de ácido cítrico. Los exámenes histológicos postoperatorios demostraron formación ósea y en algunas zonas previamente contaminadas de la superficie del implante se observó oseointegración. Los autores concluyeron que la peri-implantitis podría ser tratada con éxito (28, 29). En 1995 Mellonig y colaboradores lograron rellenar defectos óseos en seres humanos desinfectando las superficies implantarias con tetraciclina y rellenando los mismos con una combinación de hidroxapatita y tetraciclina protegido con una membrana de e-PTFE (30). Ericsson y colaboradores en 1996 estudiaron la re-oseointegración en defectos óseos inducidos mediante ligadura después del curetaje y limpieza de la superficie de los implantes con delmopinol. Estos autores encontraron que en esa situación experimental no se producía re-oseointegración (31). En 1997 Hürzeler y colaboradores realizaron una evaluación histológica del tratamiento de la peri-implantitis provocada por ligaduras infragingivales en perros beagle usando regeneración osea guiada y diferentes tipos de injertos óseos. Las superficies implantarias fueron tratadas con eyección de sistema aire polvo abrasivo. Los animales fueron medicados en forma sistémica con antibióticoterapia. Los resultados revelaron una significativa oseointegración (32).

En 1999 Persson y colaboradores (33) instalaron implantes de titanio en los sitios de premolares previamente extraídos en perros beagle e indujeron peri-implantitis a los fines de estudiar el efecto desinfectante del tratamiento local con piedra pómez y la administración de antibióticos por vía general o sistémica. Los estudios histológicos mostraron resolución del cuadro inflamatorio y nueva formación de hueso en los defectos previos al tratamiento antimicrobiano y terapia local. La cantidad de re-

oseointegración fue reducida presentado una cápsula de tejido conectivo denso. Esta cápsula de entre 50 μm y 200 μm de ancho se observó consistentemente libre de células inflamatorias y rica de fibras colágenas paralelas a la superficie implantaria y separando el implante del hueso neoformado.

Wetzel y colaboradores en 1999 en un estudio experimental en perros beagle analizaron la re-oseointegración frente a implantes de titanio con diferentes tratamientos superficiales, colocados en sitios donde se indujo peri-implantitis mediante ligaduras. Ellos utilizaron regeneración ósea guiada, clorhexidine como desinfectante superficial y antibióticos por vía general.

Los resultados histológicos demostraron una vez más que los defectos óseos peri-implantarios pueden ser rellenados con hueso, cuando la infección es controlada a través de una efectiva terapia antibacteriana. Sin embargo resultó difícil conseguir re-oseointegración (34).

La influencia de la limpieza abrasiva sobre las características superficiales de los implantes y su relación con la reingeniería ósea no ha sido estudiada exhaustivamente. En 1994 Dennison y colaboradores estudiaron diferentes técnicas de limpieza en superficies de diversos tipos de implantes contaminados con endotoxina radioactiva y concluyeron que el sistema de aire abrasivo fue el más efectivo, mientras que la clorhexidina fue el de menor eficacia. Ellos proponen que los implantes maquinados son desinfectados más fácilmente que los de titanio con spray de plasma y los revestidos con hidroxiapatita (35). Sin embargo, algunos análisis de la composición química de la superficie de los implantes no fueron considerados (36). Parham y colaboradores en 1989 en un estudio "in vitro" compararon la adhesión de fibroblastos a superficies implantarias tratadas con spray

de plasma y con sistema abrasivo y encontraron diferencias en el comportamiento celular. Estos autores observaron algunos cambios en la topografía superficial pero no analizaron la composición elemental en las superficies de ambos grupos (37).

Recientemente, el tratamiento con radiaciones láser ha sido considerado como desinfectante de las superficies implantarias (38).

En contraste con las técnicas abrasivas otros grupos de investigación (39, 36) han trabajado sobre la aplicación del láser CO₂ en un protocolo de desinfección de la superficie implantaria. Se postula que la emisión láser liberaría energía a la superficie del implante evitando posibles alteraciones superficiales o contaminaciones metalográficas. Los procedimientos con laser son potencialmente peligrosos porque elevan la temperatura de la interfase hueso-implante sobre los 50°C (38) lo cual puede determinar una pérdida mayor aún de la oseointegración (5, 40). Si bien ésta técnica podría resultar en el futuro una alternativa fiable en la actualidad su accesibilidad y costos restringen su uso, más aún si consideramos otras posibilidades de tratamiento de la superficie implantaria contaminada (39, 36).

Se conoce que la infección bacteriana es uno de los principales factores etiológicos asociados a la reabsorción ósea peri-implantaria (1, 41, 42, 43). Si la microflora es similar en los dientes naturales enfermos tanto como en implantes (12, 17, 44) y las reacciones de los tejidos de soporte a la placa dental en dientes e implantes son semejantes, se podría inferir que el tratamiento y la reparación serán similares después que el diente o implante es desinfectado y liberado de las endotoxinas. En tal sentido la esterilización y la limpieza de la superficie implantaria de titanio contaminada puede ser un factor crítico a la hora de pretender re-establecer la salud

o convivencia de la interface implante-tejido óseo después de una infección peri-implantaria (26, 29, 45, 46).

No se han descrito modelos que permitan estudiar el efecto de diferentes contaminantes sin la incidencia de otros factores como las fuerzas que se generan clínicamente asociados a las bacterias implicadas en la periodontitis. Los modelos referidos en la bibliografía consideran diferentes variables que actúan conjuntamente en la producción de un efecto biológico. Por esta razón el modelo seleccionado para éste estudio nos permite analizar solamente la variable infección y su relación con la oseointegración. Para el estudio de la respuesta tisular se utilizò el modelo experimental “laminar test“ propuesto por Cabrini y colaboradores (47). Este modelo experimental permite estudiar la respuesta a materiales biocompatibles del tejido medular hematopoyético con capacidad osteogénica, por lo cual en condiciones experimentales adecuadas el tejido óseo encontrado es producido *de novo*.

Los efectos del tratamiento desinfectante de superficies implantarias sobre la respuesta del tejido óseo no han sido suficientemente estudiados.

La desinfección de la superficie implantaria efficientiza la biocompatibilidad de los implantes en el lecho tisular óseo, induciendo el proceso de oseointegración.

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos proponemos los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Estudiar en animales de experimentación la respuesta ósea frente al tratamiento de desinfección de la superficie implantaria a fin de resignificar en la clínica el valor de la desinfección de implantes como un modo de recuperar la oseointegración.

Objetivos Específicos:

1-Infestar superficies implantarias con placa bacteriana de pacientes con enfermedad periodontal severa e inocularlas en animales de experimentación.

2-Estudiar histológicamente la respuesta ósea producida.

3-Evaluar la desinfección de la superficie implantaria mediante raspaje ultrasónico y ácido cítrico.

4.-Caracterizar el proceso de oseointegración en respuesta a superficies implantarias desinfectadas.



Material y Métodos:

Se utilizaron 40 ratas Wistar de 90 g. \pm 10 g. peso corporal, provenientes del Bioterio del Instituto de Biología Celular.

Los animales fueron alimentados con dieta balanceada y agua "ad libitum", bajo condiciones de 12 h. luz/oscuridad.

Los procedimientos experimentales se realizaron según las normas del National Institute of Health (NIH) para el uso y cuidado de los animales de laboratorio (48).

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una solución de 8 mg de clorhidrato de ketamina (Fort Dodge®, Argentina) y 1,28 mg de xilazina (Bayer Argentina S.A.) cada 100g de peso corporal. Ambas patas posteriores fueron rasuradas en la región de la cresta tibial. Se realizó una incisión de aproximadamente 1,5cm y se disecaron los tejidos subcutáneo, muscular y ligamentos con la finalidad de exponer la superficie lateral externa de ambas tibias derecha e izquierda del animal que se utilizaron como control y problema respectivamente. En el área de la diáfisis ósea se realizó una perforación de 1,5mm de diámetro con una fresa redonda montada en un mango para permitir su accionamiento manual (49, 50) que evita el sobrecalentamiento y previene el daño tisular. (Fig.Nº1)

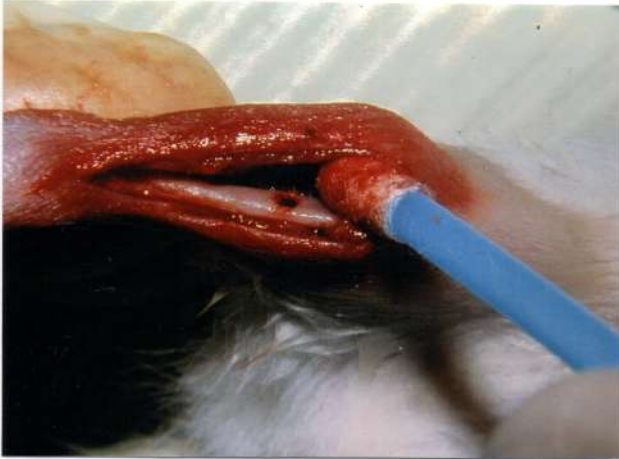


Figura N° 1. Se observa perforación en diáfisis ósea.



Figura N° 2. Implantación de laminilla de titanio.



Figura N° 3. Implantación de laminilla experimental en médula osteogénica.

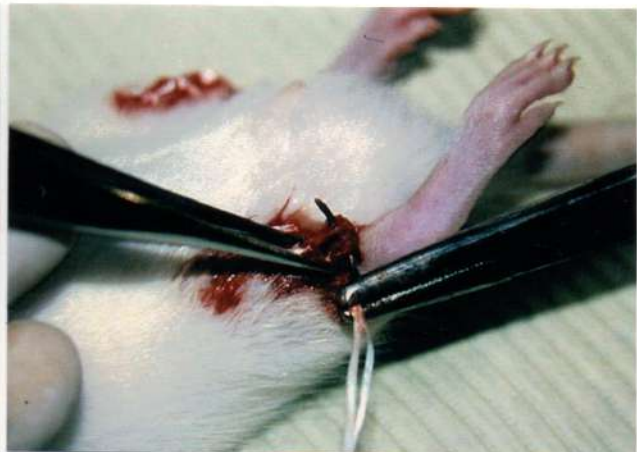


Figura N° 4. Sutura de tejidos blandos.

Grupo Control: En las perforaciones realizadas en las tibias derechas se implantaron laminillas de titanio standard (n=40), sin tratamiento superficial, de 5mm de longitud, 1mm de ancho por 0,1 mm de espesor (Fig.N° 2).

Estos implantes son los controles respectivos de las laminillas implantadas en las tibias izquierdas (problemas)(Fig. N° 3). Las heridas fueron suturadas con poli-tetrafluoretileno (Goretex. USA)(Fig. N° 4).

Grupo Problema : Se utilizaron 40 láminas estándar de titanio de 5mm de longitud por 1mm de ancho y 0,1mm de espesor de iguales características a las del grupo control que fueron previamente infectados con microorganismos aislados e identificados a partir de placa subgingival (14, 15, 16, 51) de un paciente con enfermedad periodontal severa.(Cuadro N°1)

Se tomaron muestras de placa bacteriana periodontopatógena de un paciente con enfermedad periodontal severa con consentimiento informado en la Cátedra de Periodoncia “B” de la Facultad de Odontología de la UNC. Previo aislamiento relati-

Periodos de experimentación	Tibia derecha (controles)	Tibia izquierda (problemas)	Análisis microbiológicos
15 días (n=10) y 30 días (n=10).	Laminillas estándar implantadas (n=20)	Laminillas estándar implantadas infectadas (n=20)	Laminillas infectadas (n=10)
15 días (n=10) y 30 días (n=10).	Laminillas estándar implantadas (n=20)	Laminillas estándar implantadas infectadas-desinfectadas (n=20)	Laminillas infectadas-desinfectadas (n=10)
	Total controles (n=40)	Total laminillas problemas implantadas (n=40)	Total laminillas problemas para estudios microbiológicos (n=20)

Cuadro N°1. Grupos experimentales. Muestra la distribución de las laminillas de titanio implantadas y analizadas por estudios microbiológicos (controles y problemas).

-vo del campo operatorio con rollos de algodón estériles, se eliminò la placa bacteriana supragingival por raspaje en sentido coronal con una cureta periodontal tipo Gracy esterilizada (N° 1-2 y 13-14). Para la toma de material se utilizaron conos de papel de tamaño 60 (Sharpys). Se introdujeron firmemente de a uno en el interior de la bolsa periodontal durante 30 segundos (Fig.N° 5) y luego se colocaron 2 (dos) en tubos Ependorff que contenian medio de transporte VMG III y dos (2) en un medio de gelatina al 1 %.

A continuación se realizó el procesamiento microbiológico de la placa bacteriana periodontopatògena aislando e identificando los microorganismos anaerobios y microaeròfilos más característicos previamente seleccionados de acuerdo a la bibliografía citada (52, 53), a saber: *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* y *Campylobacter rectus*.

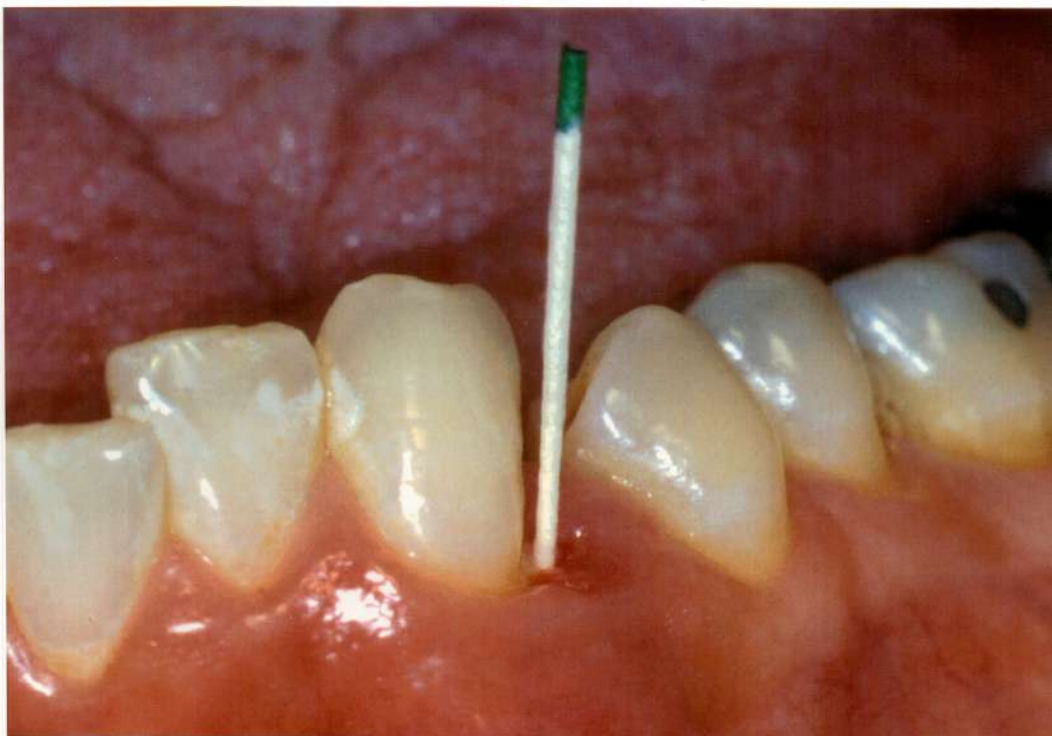


Figura N° 5. Toma de material (placa periodonto-patògena).

Se realizó aislamiento relativo del campo con rollos de algodón, gaza, etc. y se preservó la anaerobiosis prerreduciendo el medio de transporte VMG III mediante exposición a baño maría durante 5 minutos.

Las muestras fueron procesadas durante los 30 minutos posteriores a su

recolección según el siguiente protocolo: 1.-homogeneización de la muestra
2a.-siembra y 2b.-incubación.
3.-exámen de los cultivos primarios y aislamiento.

1-Homogeinización de la muestra.

a.- Se homogeneizó la muestra contenida en el medio de gelatina al 1 % aspirando y expeliendo el contenido del ependorff con jeringa de 100 microlitros, repitiendo la operación 10 veces. Luego se colocó una gota del homogeneizado sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Se practicó de inmediato un examen en microscopio de fondo oscuro con un objetivo de 100x. Se clasificaron los microorganismos según su morfología en 5 tipos: Bacilos rectos y curvos móviles, cocos, filamentos y treponemas.

b.- Se homogeneizó la muestra contenida en el medio de transporte VMG III mediante agitación durante 30 segundos y luego se procedió a la siembra.

2a.- Siembra:

Se usaron medios de cultivo selectivos y no selectivos: la técnica de siembra fue por agotamiento en cuatro cuadrantes (Fig.Nº5).

Los medios utilizados fueron:

a) Agar Brucella, sangre lacada , N acetil neuramínico suplementado con vitamina K y hemina (BA-N-AN suplementado), que permite la recuperación de todo tipo bacteriano (no selectivo): aerobios y anaerobios Gram (+) y Gram(-).

En este medio de cultivo se sembraron 3 (tres) placas, una mediante una ansada directa tomada del medio de transporte y a las otras 2 con diluciones 10^{-4} y 10^{-6} en PBS (obtenidas por el sistema de dobles diluciones).

b) Agar Brucella, sangre lacada, N acetil Neuramínico suplementada con vitamina K y hemina más Vancomicina (BA-N-AN+V), que es un medio selectivo que permite recuperar sólo aerobios y anaerobios gram (-) inhibiendo a los gram (+).

Se tomó una ansada del medio de transporte VMG III y se sembró en los cuatro cuadrantes por técnica de agotamiento.

c) Medio TSBV (agar tripticasa soja, Bacitracina + Vancomicina), que es un medio selectivo para *Actinobacillus actinomycetencomitans*.

Con pipeta de 100 microlitros se tomaron 50 microlitros del medio de transporte VMG III (es más cantidad que una ansada). Luego se depositó en el centro y se sembró por agotamiento en los cuatro cuadrantes.

d) Medio de agar Chocolate (ACH) el cual se empleó para recuperar *Eikenella corrodens*.

2b.- Incubación.

Los medios BA-N-AN y BA-N-AN + V fueron incubados durante 10 días a 35° C en atmósfera anaeróbica (Jarra de GASPAK c/ sobres para generar anaerobiosis) y se colocaron tiras indicadoras de anaerobiosis (azul de metileno).

Los medios TSBU y ACH se incubaron durante 7 días a 35° C en atmósfera de microaerofilia (Jarra de GASPAK c/sobres para generar microaerofilia).

NOTA;

- La vitamina K (1 microgramo /ml permite la recuperación de bacilos Gram (-) pigmentados.
- Hemina (5 microgramos/ml. mejora el desarrollo de Bacteroides fragilis y bacilos gram (-) pigmentados.
- Sangre lacada se usa para acelerar la producción de pigmento.
- Ac.N acetil Neuraminico (N-AN) para aislamiento de Bacteroides forsythus.

4.- Exámen de los Cultivos Primarios y Aislamiento.

Los cultivos primarios fueron examinados recién a partir de las 72 h. y se los examinó rápidamente cada 48 h. hasta el séptimo día en que se visualizaron colonias típicas.

Una vez seleccionados los morfotipos a cada colonia se le realizaron los siguientes procedimientos:

- 1.- Observación y descripción macroscópica.
- 2.- Observación microscópica por coloración de Gram.
- 3.- Prueba de tolerancia al oxígeno.

Para el estudio de morfotipos se consideró:

a) Morfología, descripción macroscópica de la colonia, forma, tamaño, bordes, aspecto (opaco o brillante) , consistencia, etc.

b) Pigmento.

c) Fluorescencia.

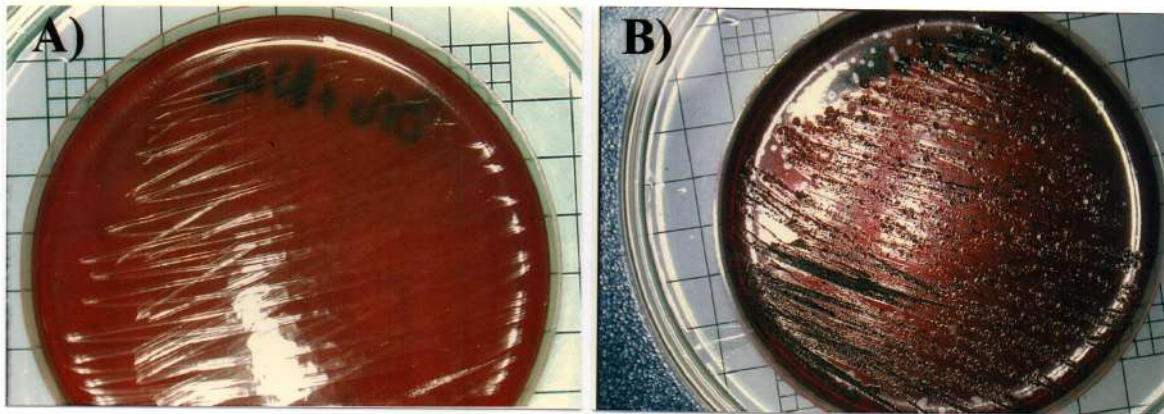


Figura N° 5, A y B). Cultivos primarios (directo de la muestra obtenida del paciente). Se realizó siembra por agotamiento en medios selectivos y no selectivos e incubados en anaerobiosis y microaerofilia. Se observaron diferentes morfotipos. Estos se repicaron en medios específicos para el desarrollo de cada periodontopatógeno investigado.

5.-Identificación:

De acuerdo a la coloración de gram se procedió de la siguiente manera con los bacilos Gram (-). Se repicó cada morfotipo en agar sangre sembrando con la técnica de diseminación con espátula de Drigalsky y se colocaron discos de Vc (Vancomicina) 5 microgramos, Co (Colistin) 10 microgramos y Kn (kanamicina) 1000 microgramos y se incubaron en atmósfera anaeróbica durante 5 días (Fig.N°6).



Figura N° 6. Se observa un cultivo secundario de un morfotipo levantado de un cultivo primario y sembrado por diseminación en un medio de agar sangre y en anaerobiosis al cual se le colocaron discos (de alta potencia) con antibióticos siguiendo el protocolo de identificación.

A los diferentes aislamientos se le realizaron los siguientes pruebas bioquímicas:

INDOL

BILIS (discos de bilis)

NITRATO

LIPASA

Se identificaron:

A) **Bacilos gram (-) pigmentados:**

La principal característica fué la de formar pigmento marrón a negro luego de 72 a 92 h de incubación. Mostraron fluorescencia bajo luz ultravioleta. Esta característica

se observó mejor en cultivos jóvenes de 18 a 24 h donde no hubo o fué escasa la producción de pigmento.

Incluyó dos grupos:

1.- *Prevotella spp*, la producción de lipasa e indol que fué positiva permitió diferenciar al grupo *Prevotella intermedia* de *Prevotella nigrescens*. Ambas presentaron fluorescencia.

2.-*Porphiromonas gingivalis*, se diferenciaron fácilmente del género anterior por su sensibilidad a Vc (diferente de la mayoría de los bacilos Gram-). Son resistentes a Co y Kn. No desarrollaron en bilis, indol (+) y Lipasa (-). No se observó fluorescencia.

B) Fusobacterium nucleatum.

Se identificaron según las siguientes pruebas bioquímicas:

Sensibles a Kn y Co resistentes a Vc. Variables a bilis, generalmente no desarrollan. No reducen el nitrato, indol (+) y lipasa (-). La morfología fué la de bacilos gram (-) fusiformes finos, no pigmentan y no fluorescen.

C) Bacteroides forsythus.

La identificación por pruebas bioquímicas fué la siguiente: son sensibles al Co. y resistentes a la Vc y frente a la Kn fué variable, generalmente (+). No redujo el nitrato, indol (-), fué sensible a bilis y esculina (+). La morfología es la de bacilos Gram (-) pequeños, no fluorescen, crecen con N-AN y hace satelitismo con *Fusobacterium nucleatum*.

Especies identificadas:

1.-Bacilos Gram – pigmentados;

1a.*Prevotella spp:* a.-*Prevotella intermedia*

b.-*Prevotella nigrescens*

1b.*Porphyromonas gingivalis.*

2.-*Fusobacterium nucleatum.*

3.-*Bacteroides forsythus.*

4.-*Actinobacillus actinomycetemcomitans.*

5.-*Eikenella corrodens.*

6.-*Campylobacter rectus.*



Infección y desinfección de las laminillas experimentales.

Una vez obtenidos los subcultivos se procedió a levantar mediante un toque con ansa sobre la colonia de cada especie aislada y se sembró con dicho material 2 ml. de Caldo de Tioglicolato colocado en un tubo ependorff. Las muestras fueron homogeneizadas en forma vigorosa con el ansa cargada sobre las paredes del ependorff durante 30 segundos. Inmediatamente se infectaron las laminillas de titanio que fueron colocadas en las tibias del lote de ratas correspondientes (experimentales).

Sub-grupo A: Se infectaron 20 laminillas de titanio (n=20) y se implantaron en el lecho medular osteogénico de la tibia izquierda.

Por otra parte diez laminillas (n=10) de titanio infectadas fueron analizadas microbiológicamente para identificar los micro-organismos de cada laminilla al momento de la implantación.

Sub-grupo B: Se infectaron 20 laminillas de titanio (n=20) y fueron desinfectadas de acuerdo al siguiente tratamiento:

1ro.- Raspaje ultrasónico de toda la superficie implantaria por medio de una punta de titanio accionada por una unidad ultrasónica (30.000 ciclos. Satelec. Francia).

2do.- Sobre la superficie así tratada se aplicó ácido cítrico puro durante 30 segundos.

3ro.- Las laminillas se lavaron profusamente con solución fisiológica estéril durante 10 segundos.

Las veinte (n=20) láminas de titanio desinfectadas según el procedimiento descrito fueron implantadas en el espacio medular de la tibia izquierda en las mismas condiciones que el grupo control (tibia derecha) y suturadas con politetrafluoretileno (Gore-tex. USA).

Las diez (10) laminillas restantes fueron analizadas microbiológicamente a los fines de evaluar el efecto del tratamiento desinfectante.

A los 15 y 30 días post-implantación, los animales fueron anestesiados por inhalación con éter. Las tibias (control y problemas) fueron resecadas, radiografiadas (Fig.Nº7) y fijadas en formol tamponado al 10%.

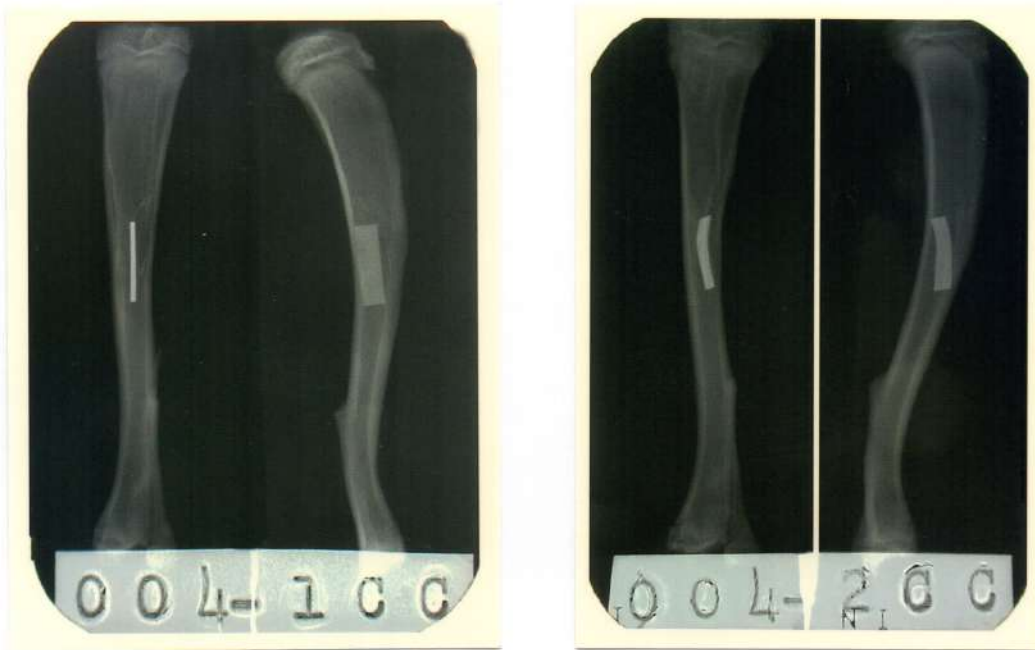


Figura N°7. Radiografías de tibias experimentales con un implante laminar de titanio.

A los fines de estudios microscòpicos las tibias fueron procesadas según inclusión en metacrilato de metilo.

Se realizaron cortes perpendiculares al eje largo del implante los que (Fig.N° 8) fueron desgastados con máquina pulidora y terminados con lijas al agua AX-51.000 (3 M®, USA Inc.) de 600, 400 y 200 μ m y glicerina para lograr un adecuado terminado superficial. Se obtuvieron cortes de 50 μ m de espesor y estudiaron microscòpicamente sin colorear (Fig. N° 9) y mediante coloración nuclear con azul de toluidina, borato de Na al 1% y fijados con molibdato de amonio al 5%(Fig. N° 10).

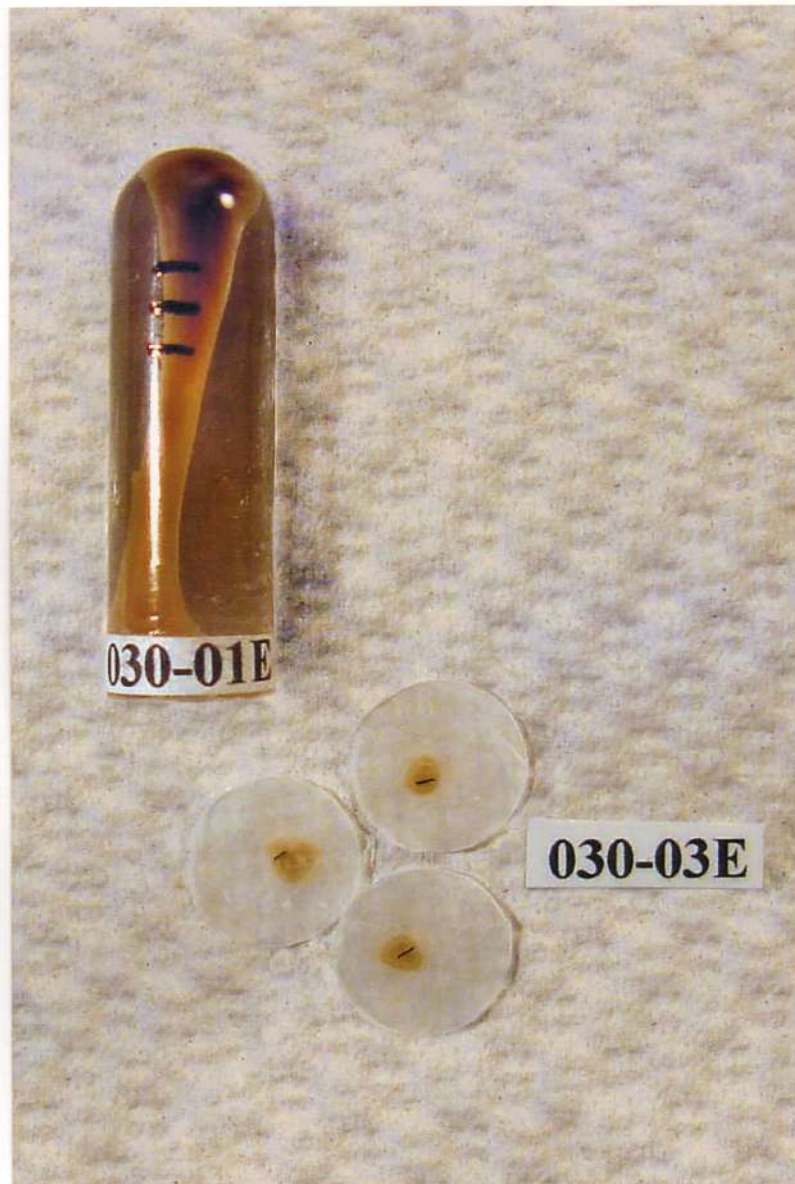


Figura N°8. Fotografía de una tibia en inclusión plástica y de cortes perpendiculares.



Figura N° 9. Microfotografía de una muestra (implante problema).Corte por desgaste. Inclusión en plástico. Sin colorear.

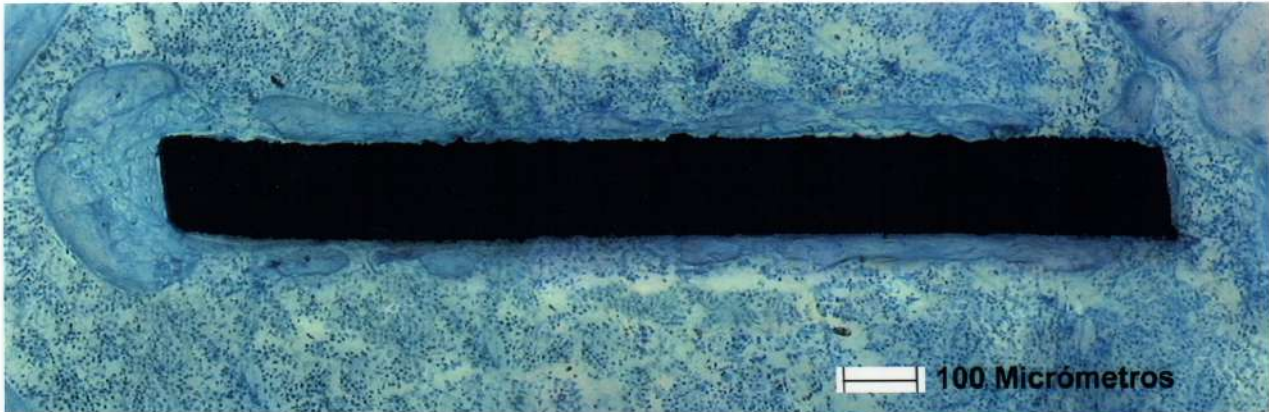


Figura N° 10. Microfotografía de una muestra (implante control). Corte por desgaste. Inclusión en plástico. Coloración: Azul de Toluidina.

Se realizó el análisis histomorfométrico mediante un analizador de imágenes . Para las determinaciones de los parámetros asociados a la oseointegración se utilizó el programa PRO IMAGE PLUS (Media/Cybernetics. 2003). Se evaluó:

- a.-Número de núcleos de formación ósea (NFO) peri-implantaria.
- b.-Área de hueso oseointegrado (AHOI) con el implante, expresado en mm².
- c.-Longitud de hueso oseointegrado (LHOI) con el implante expresado en mm.

(Fig.N°11).

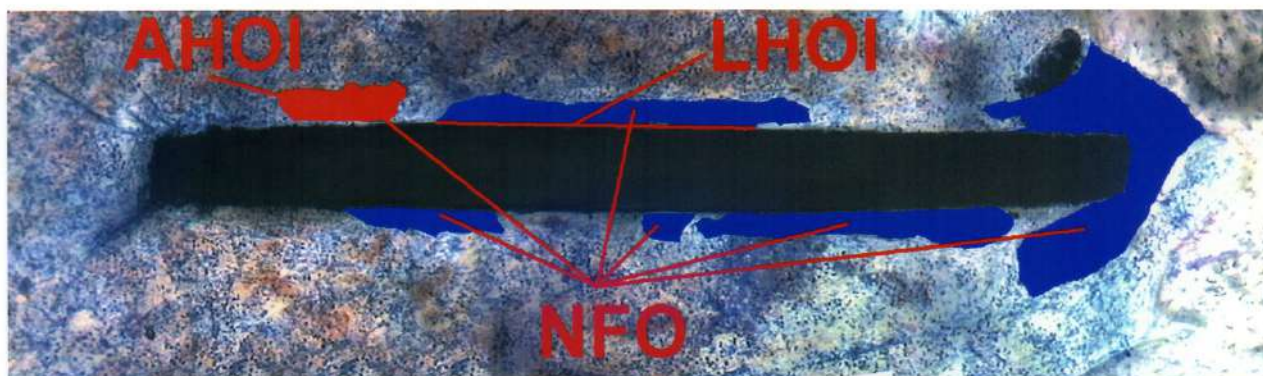


Figura N° 11. Microfotografía de una muestra (implante problema). Se indican los parámetros evaluados por histomorfometría.

Análisis Estadístico

Para comparar los tratamientos C, I y ID a los 15 ó 30 días se utilizó el test de Análisis de Covarianza (ANCOVA) a fin de descontar el efecto del largo y ancho del implante. Las variables *número de núcleos de formación ósea (NFO) peri-implantaria*, *área de hueso oseointegrado (AHOI)* y *longitud de hueso oseointegrado (LHOI) con el implante* fueron consideradas variables respuestas o dependientes y las variables independientes consideradas fueron *tiempo* y *grupo* (tratamientos). Las variables largo y ancho del implante fueron incorporadas como covariables.

Se realizaron los test diagnósticos a fin de corroborar los supuestos del modelo (distribución Normal con $\mu=0$ y σ^2 común) los cuales fueron Test de Shapiro Wilks modificado y la prueba de Levene. La variable área de hueso en contacto con el implante fue transformada a su \log_{10} a fin de cumplir el supuesto de homocedasticidad.

Las comparaciones *a posteriori* fueron realizadas a través de contrastes ortogonales. Para determinar diferencias estadísticamente significativas se fijó el valor $p<0,05$.



RESULTADOS

El análisis microscópico de todas las muestras controles y experimentales no mostraron modificaciones estructurales del tejido óseo en el período post-operatorio tanto inmediato como mediato.

Estudio Histológico

Cuando se estudiaron los cortes histológicos de las tibias controles y experimentales *no infectadas* a un período de 30 días se encontró formación de tejido óseo neoformado en íntimo contacto con la superficie metálica de titanio.

En la Fig.12 se observa implante de titanio en médula osteogénica. Se aprecia formación de hueso en algunas zonas con disposición laminar en íntimo contacto con el implante con una longitud de hueso óseo-integrado (LHOI) $6,68 \pm 1,66$.

En la Fig. 13 observamos un implante no infectado tratado según el método propuesto, en médula osteogénica. Se observa hueso oseointegrado de tipo laminar asociado a gran parte de la longitud implantaria, LHOI $10,19 \pm 1,99$.

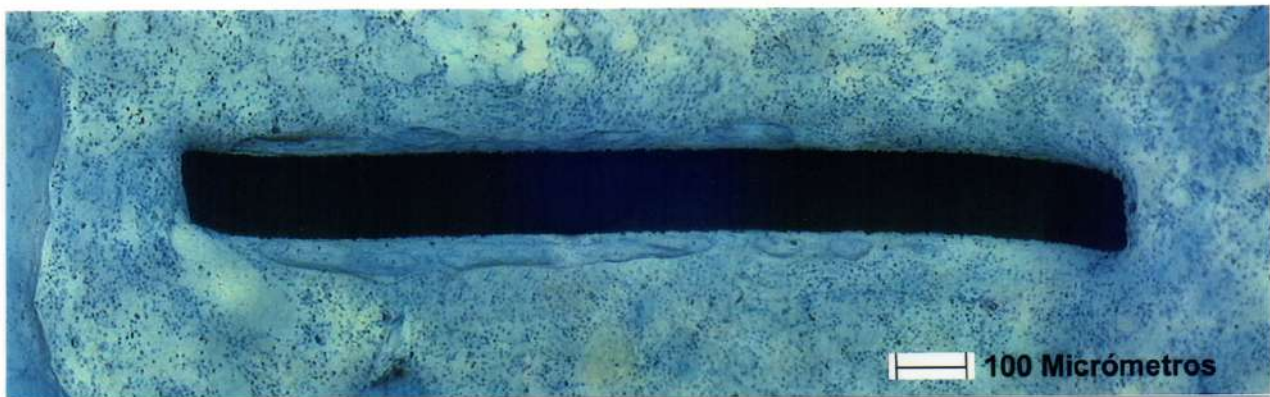


Figura N° 12. Microfotografía de una muestra (implante control). Corte por desgaste. Inclusión en plástico. Coloración: Azul de Toluidina.

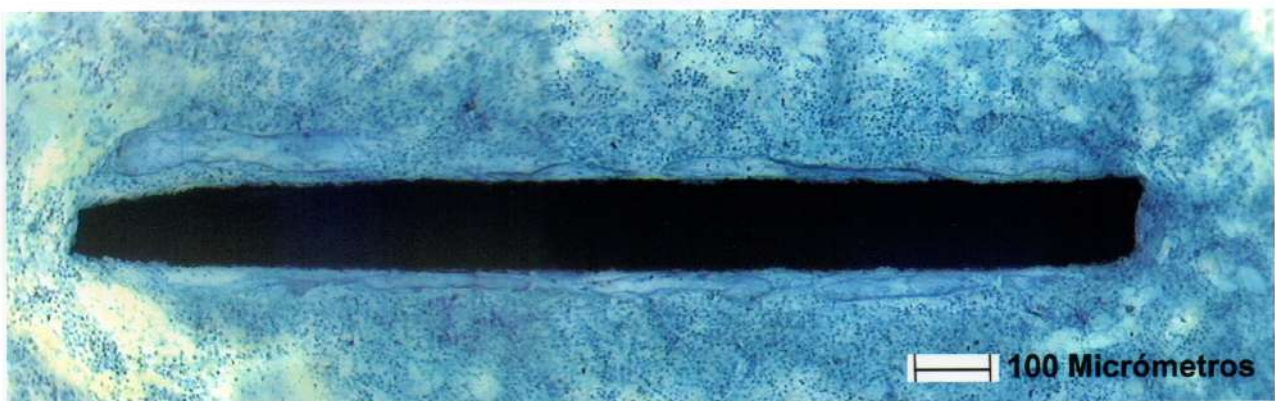


Figura N° 13. Microfotografía de corte experimental por desgaste (no infectado). Inclusión en plástico. Coloración: Azul de Toluidina.

Los estudios estructurales a un período de 15 días en implantes de titanio *infectados con placa periodontopatogena* mostraron comportamientos diferentes.

Los implantes control (15 días) muestran en algunos casos hueso en formación a manera de núcleos óseos cercanos a la superficie del implante (Fig. N° 14).

En otros implantes controles se encontró a lo largo de la laminilla núcleos óseos asociados a su superficie en algunas zonas mientras en otras se observa tejido medular osteogénico interpuesto entre el implante y el tejido óseo, LHOI: 6.68 ± 1.3 .

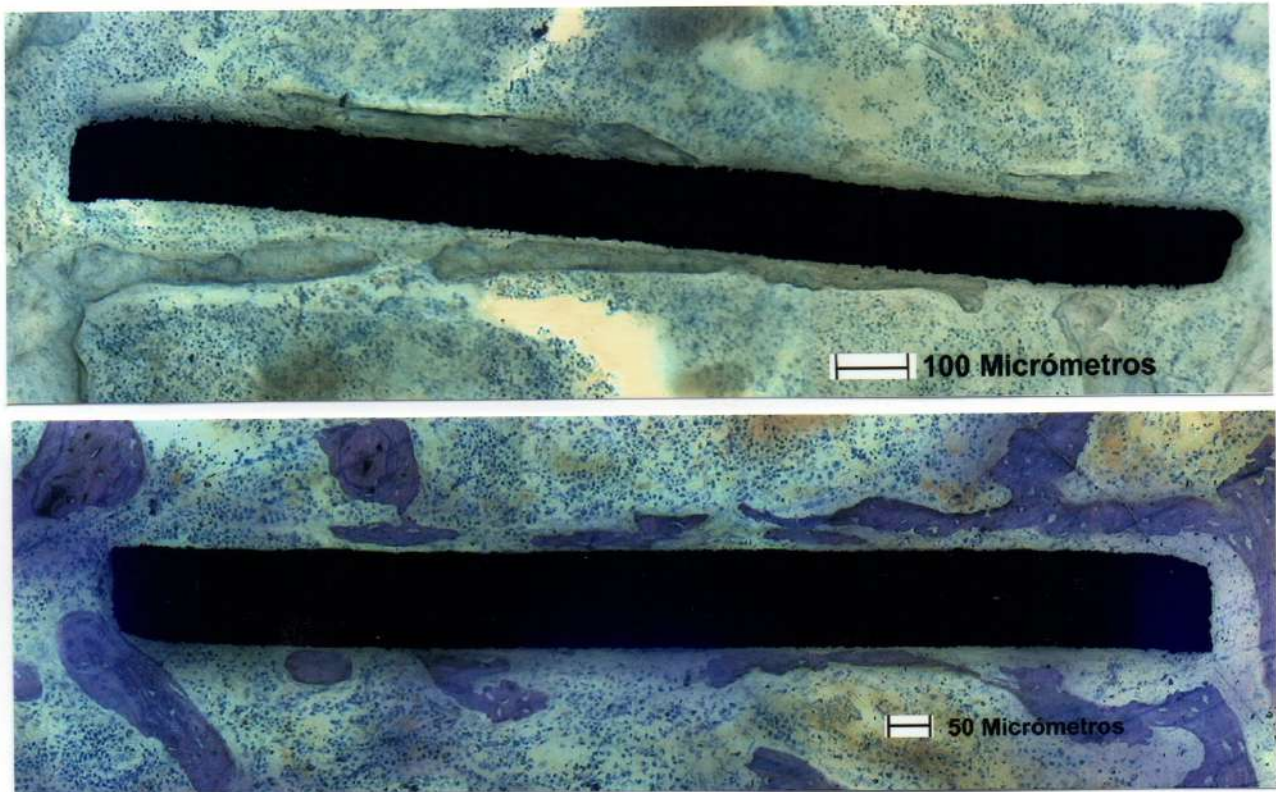


Figura N° 14. Microfotografías de muestras control (15 días). Cortes por desgaste. Inclusión en plástico. Coloración: Azul de Toluidina.

La Fig. N° 15 muestra la imagen de una laminilla de titanio infectada e implantada en la médula osteogénica. Se observa escaso tejido oseointegrado en relación al implante, LHOI: 3.22 ± 1.16 .

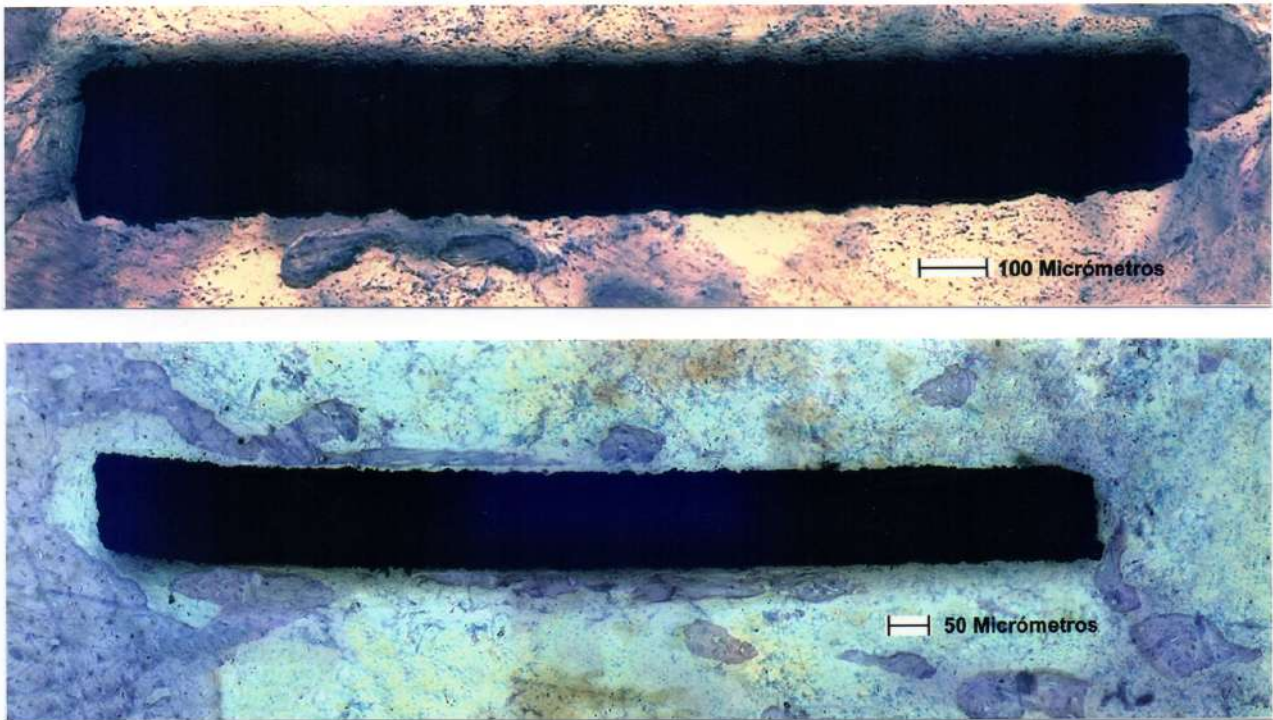


Figura N° 15. Microfotografías de muestras problema infectadas (15 días). Corte por desgaste. Inclusión en plástico. Coloración: Azul de Toluidina.

Cuando los implantes fueron *infectados con placa periodonto-patógena* y *posteriormente desinfectada* con raspaje ultrasónico, ácido cítrico al 1% y lavados con solución fisiológica se encontró sistemáticamente tejido óseo oseointegrado sobre la superficie de la laminilla de titanio como se observa en la microfotografía N° 16, LHOI 11.8 ± 1.5 .

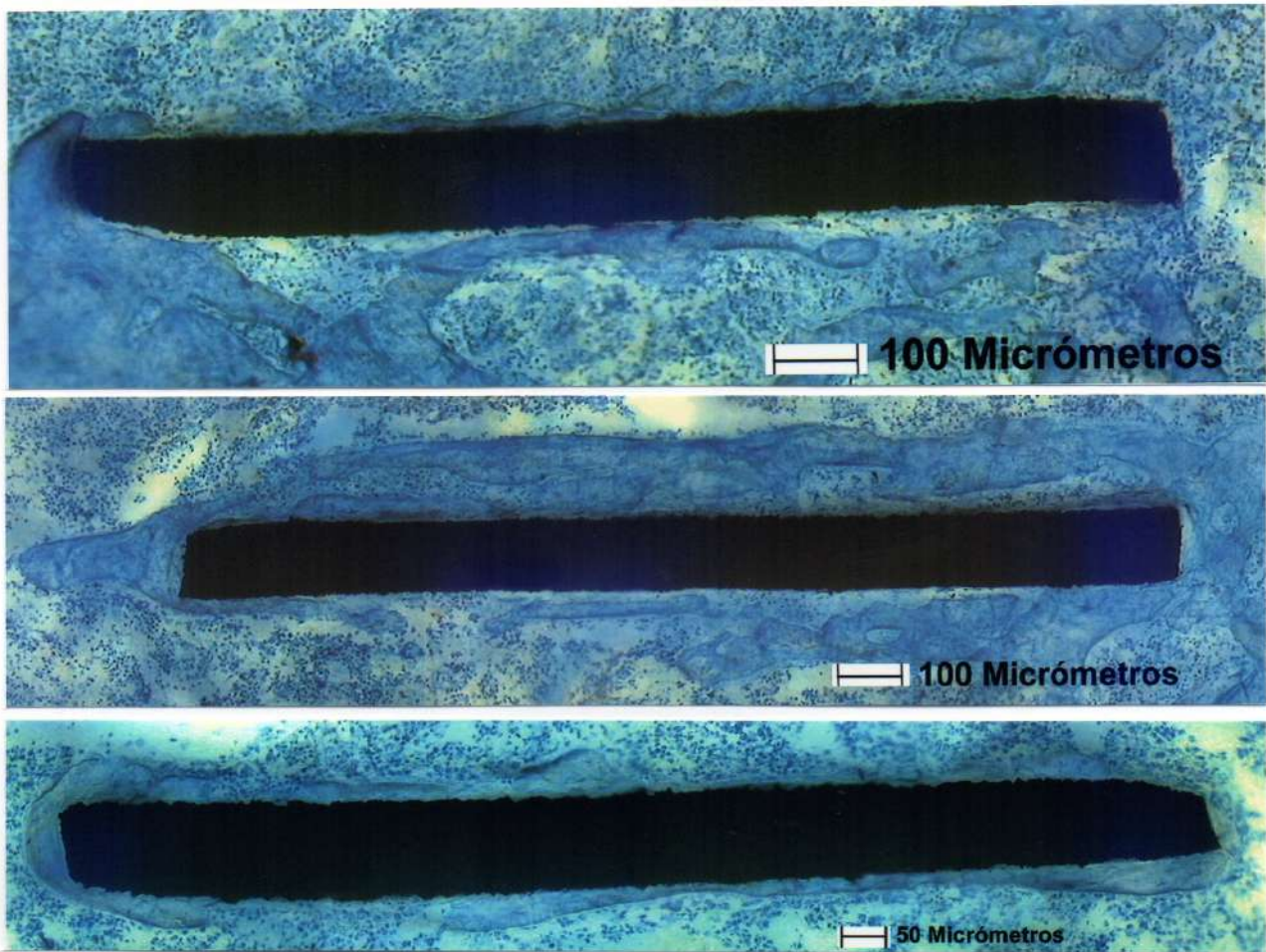


Figura N° 16. Microfotografías de muestras problema infectada/desinfectadas (15 días) Corte por desgaste. Inclusión en plástico. Coloración: Azul de Toluidina.

La fotomicrografía N° 17 corresponde a una muestra control de un implante de titanio 30 días post-implantación. Se observa una amplia área de hueso laminar rodeando el implante en plena médula osteogénica, LHOI 6.68 ± 1.66 .

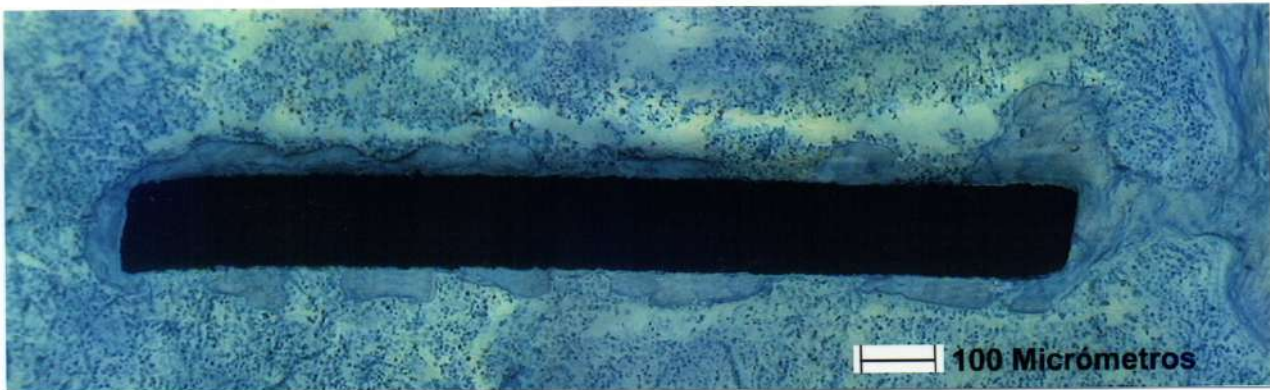


Figura N° 17. Microfotografía de una muestra control (30 días). Corte por desgaste. Inclusión en plástico. Coloración: Azul de Toluidina.

La Fig. N° 18 muestra la imagen de una laminilla de titanio infectada 30 días e implantada en la médula osteogénica. Se observa escaso tejido oseointegrado en relación al implante, LHOI: 4.10 ± 1.98 .

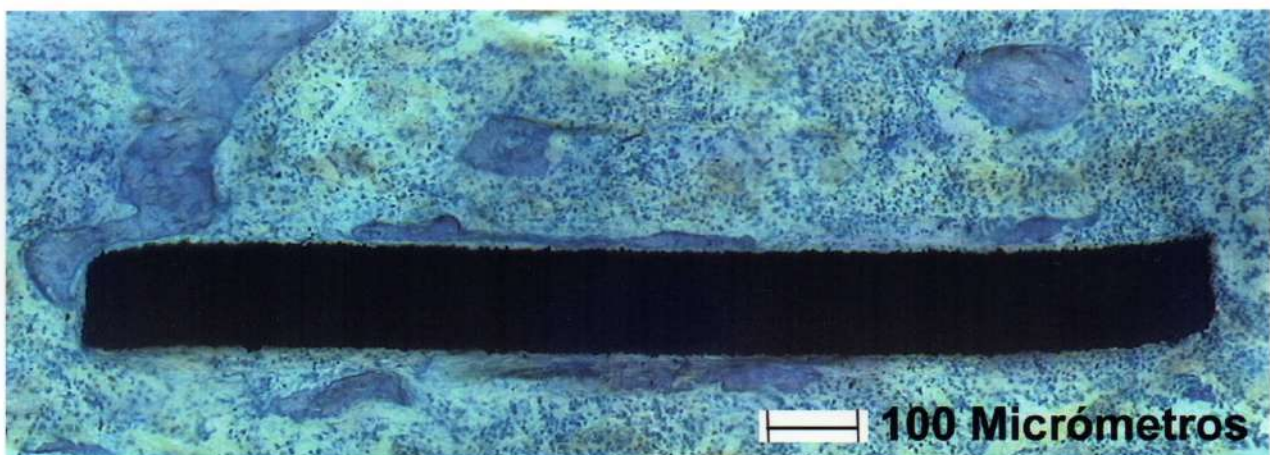


Figura N° 18. Microfotografía de una muestra problema infectada (30 días). Corte por desgaste. Inclusión en plástico. Coloración: Azul de Toluidina.

Si observamos un corte por desgaste (Fig. N° 19) correspondiente a un implante *infectado desinfectado* 30 días postimplantación en la médula osteogénica se encuentra hueso oseointegrado asociado a la longitud total del implante y un área de hueso laminar inferior a la descrita para los controles (Tabla 2) LHOI 12.85 ± 1.15 .

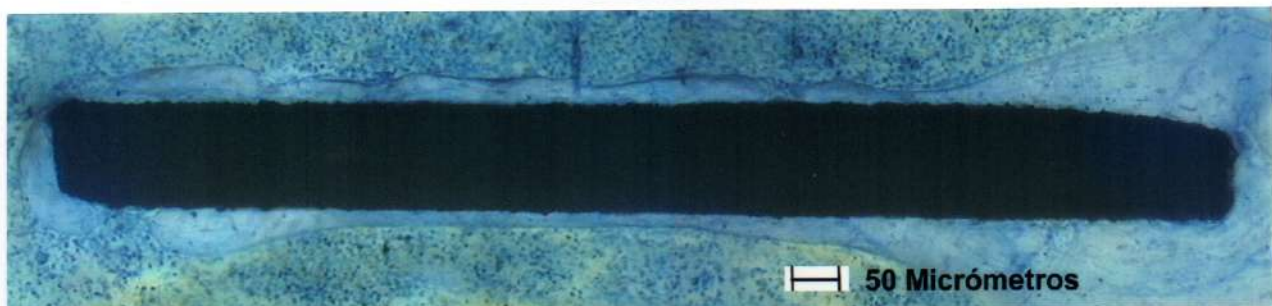
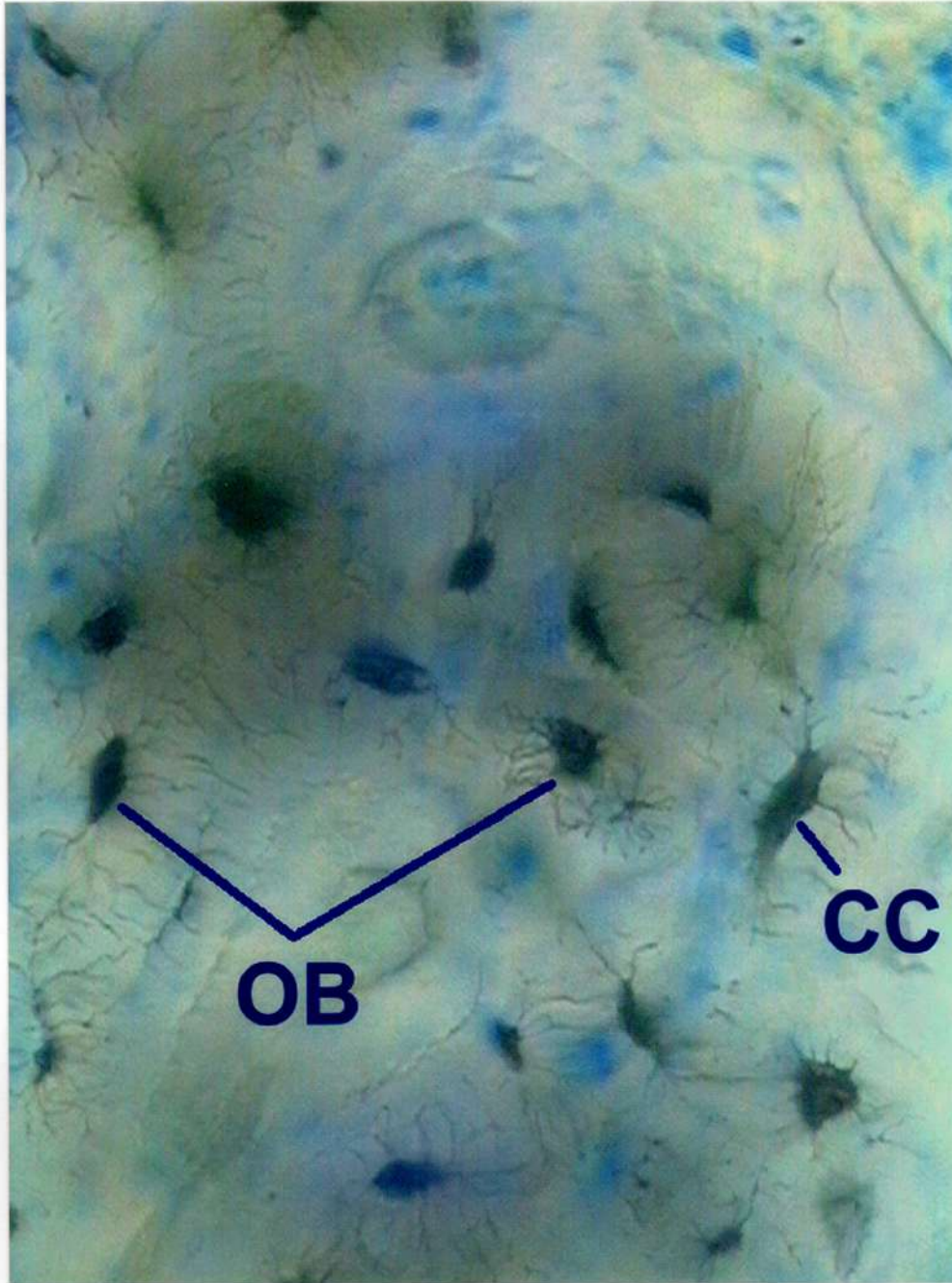


Figura N° 19. Microfotografía de una muestra problema infectada/desinfectada (30 días). Corte por desgaste. Inclusión en plástico. Coloración: Azul de Toluidina.

A mayor aumento en la Fig. N° 20 a y b se observa hueso oseointegrado de tipo laminar, con osteocitos contenidos en osteoplastos con múltiples canalículos calcóforos (a) en áreas de hueso relacionado intimamente a un implante experimental de 30 días. En b se observa parte de dos trabéculas vecinas con zonas de formación y remodelación por osteoblastos y osteoclastos.

A)



B)

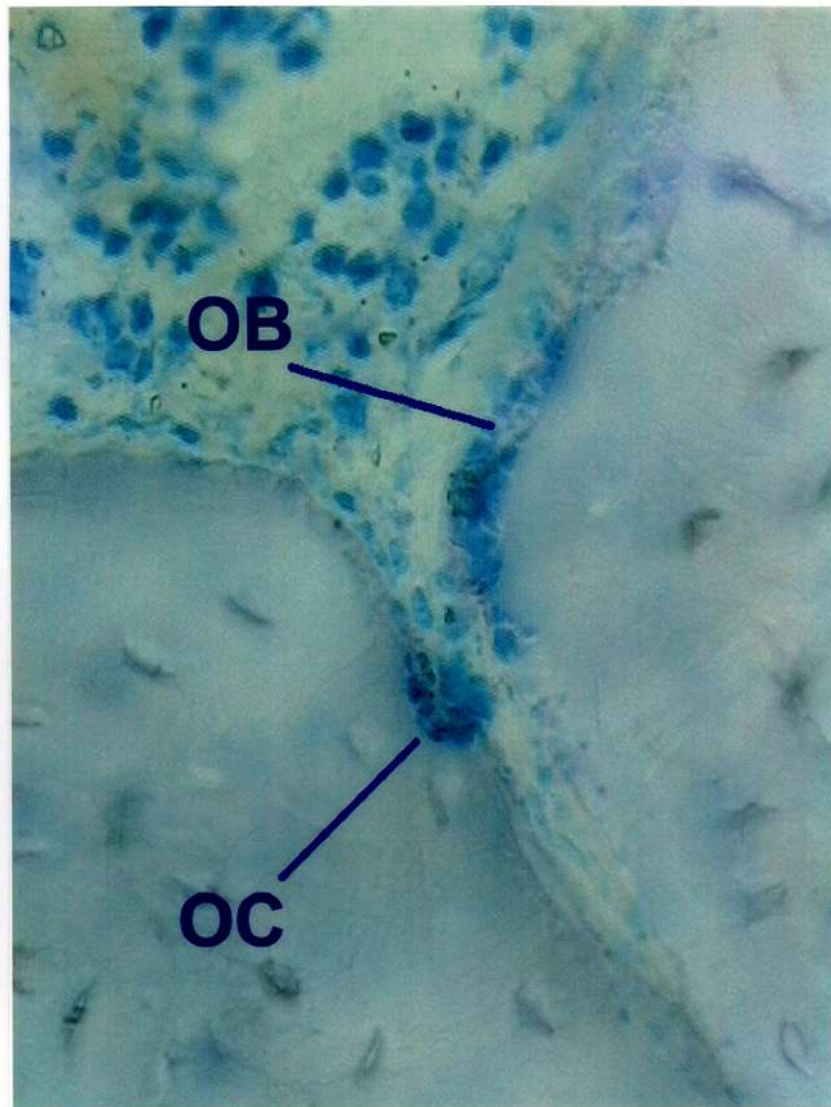


Figura N° 20. Microfotografía de una muestra control Corte por desgaste. Inclusión en plástico. Coloración: Azul de Toluidina (100x). (30 días). A) Hueso laminar con presencia de osteocitos (OB) y canaliculos calcóforos (CC); B) Osteoblastos (OB) y osteoclastos (OC).

Se observó una respuesta con presencia de mastocitos metacromáticos en muestras problema infectadas a 30 días (Fig. N° 21).

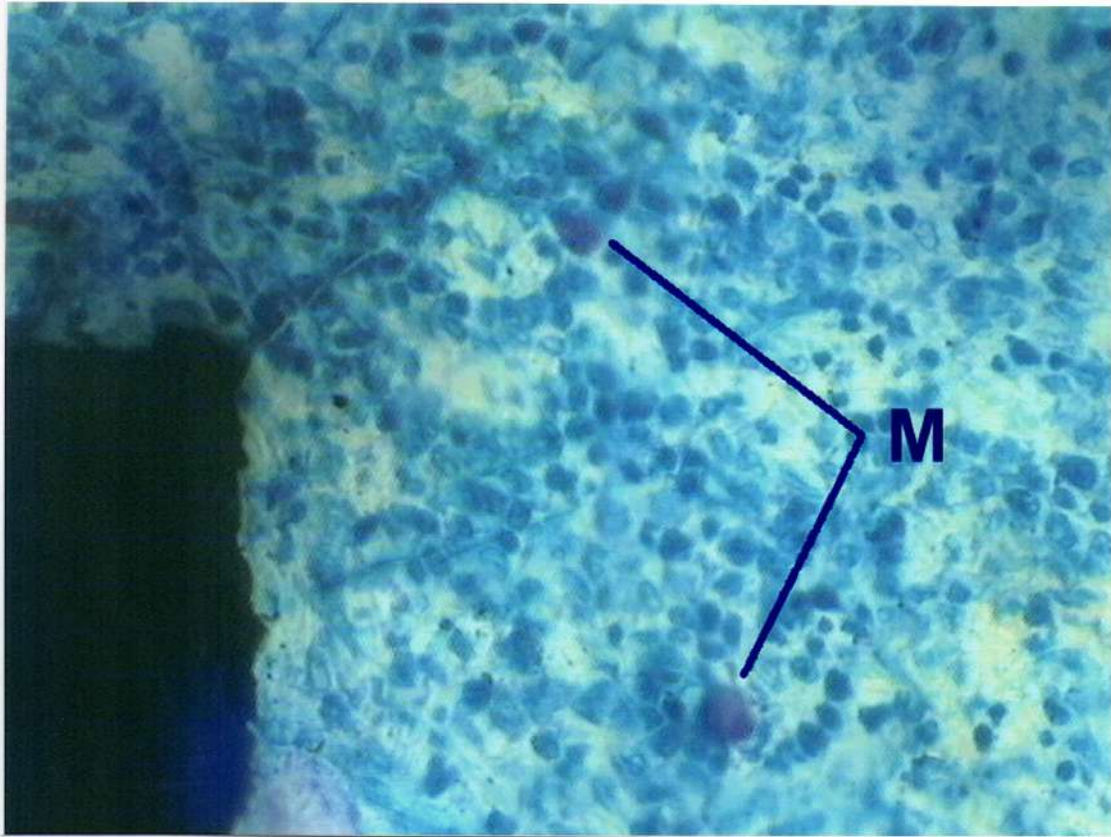


Figura N° 21. Microfotografía de una muestra problema infectada. Corte por desgaste. Inclusión en plástico. Coloración Azul de Toluidina (40x). (30 días) Médula osteogénica con mastocitos (M). Zona oscura: lámina de titanio implantado.

ESTUDIOS HISTOMORFOMÉTRICOS

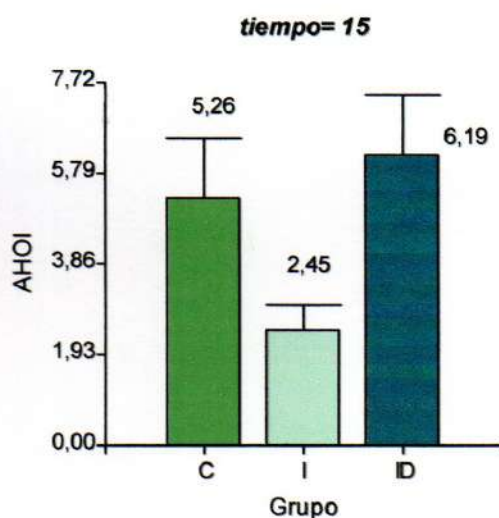
La formación de hueso fue medida por las variables *longitud de hueso oseointegrado* (LHOI) , *área de hueso oseointegrado* (AHOI) y *número de núcleos de formación ósea* (NFO) .

Las mediciones realizadas a los días 15 y 30 de las variables antes mencionadas mostraron diferencias significativas entre los tratamientos realizados ($p < 0.05$) pero no entre los tiempos estudiados ($p > 0.05$) (Tabla 1 y 2).

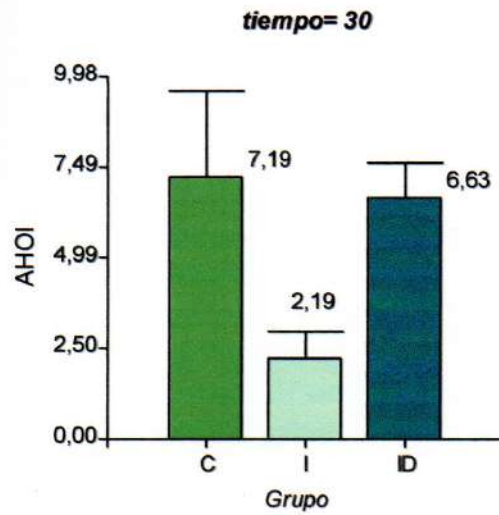
El *área de hueso osteointegrado* (AHOI) mostró un área mayor en el grupo de tratamiento *infectado-desinfectado* (ID) en relación al tratamiento *infectado* (I) ($p = 0.011$). Asimismo, los controles difirieron estadísticamente en relación al tratamiento de los infectados. (Figura 22).

Figura N° 22: Área de hueso tocando el implante a los 15 días (A) y 30 días (B) post -tratamiento (media \pm EE)(C=CONTROLES; I=INFECTADOS; ID=INFECTADOS/DESINFECTADOS)

A)



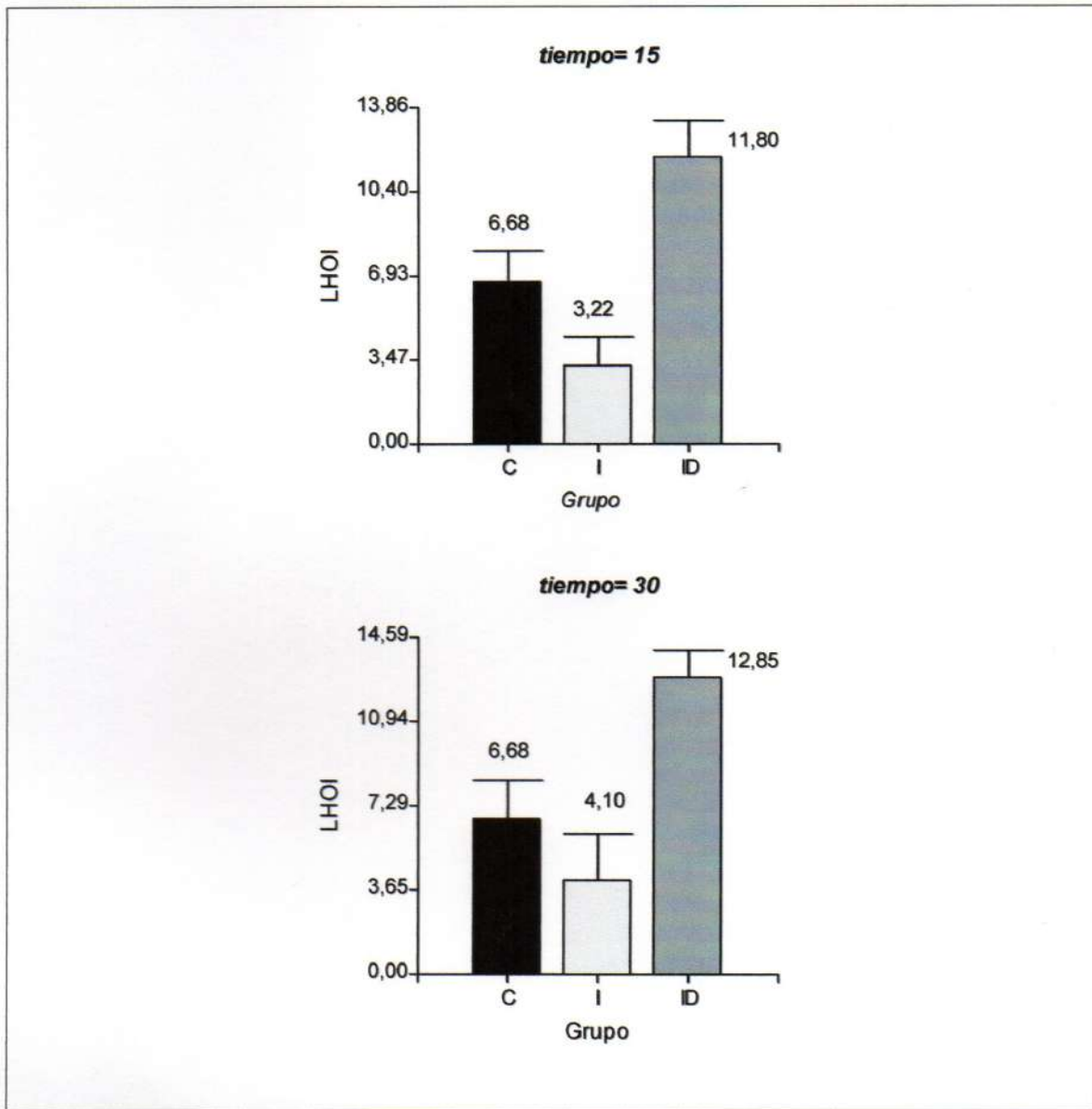
B)



En relación a LHOI se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos I e ID ($p=0.002$), siendo mayor la longitud en el tratamiento ID (Figura 23, A y B):

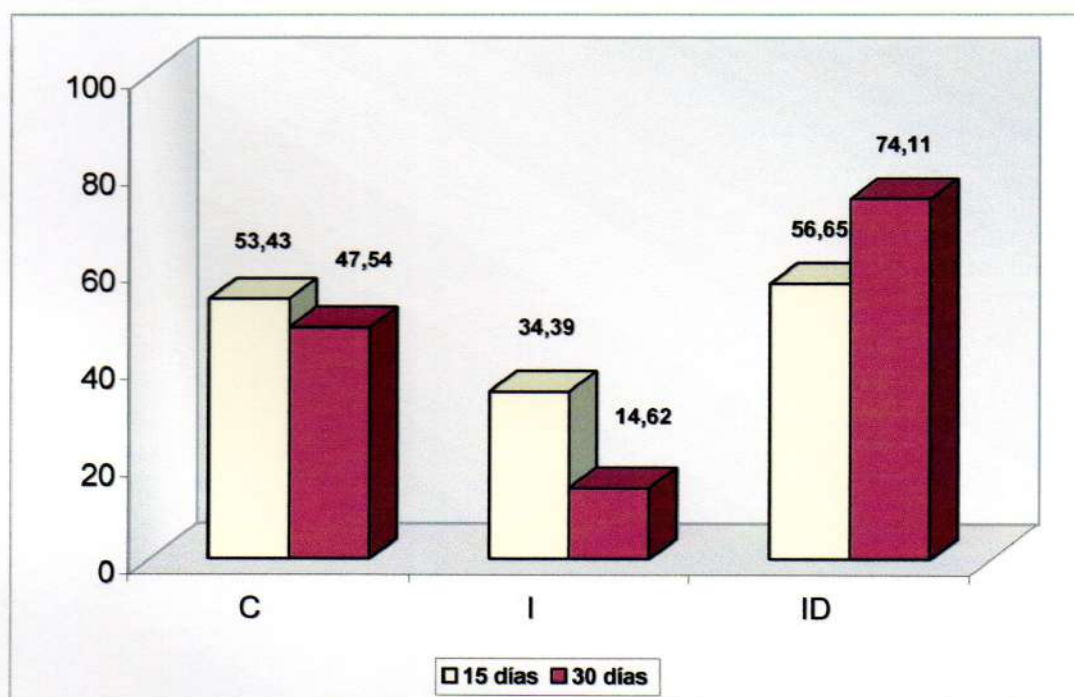
ID= 15 días =11.8;
30 días= 12.85)

Figura N° 23: Longitud de hueso tocando el implante a los 15 días y 30 días post – tratamiento(media±EE). (C=CONTRLOLES; I=INFECTADOS; ID=INFECTADOS/DESINFECTADOS)



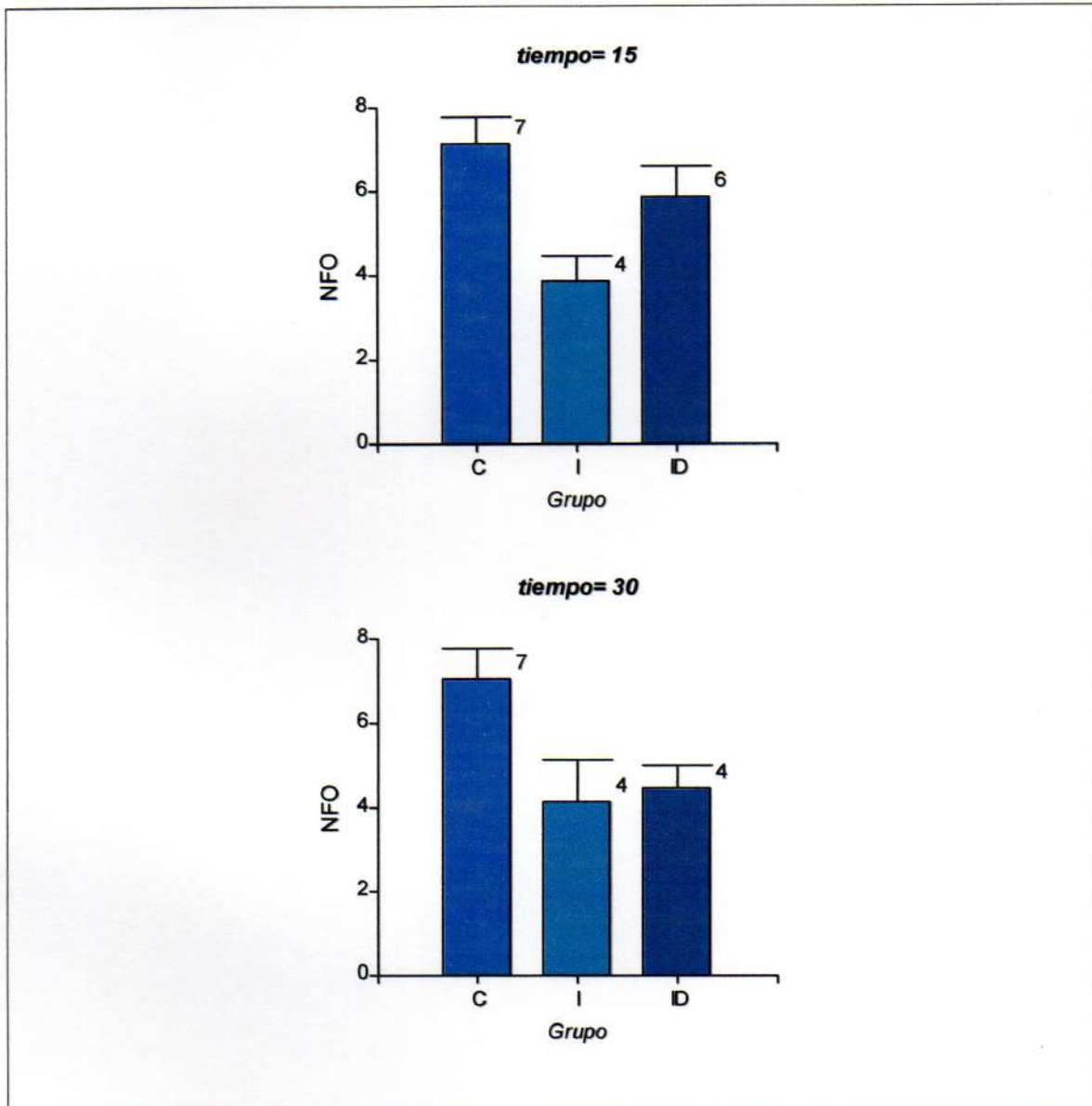
Por otra parte se calculó el porcentaje de longitud de hueso tocando el implante en relación a la longitud del implante. Se observó que en el tratamiento ID el porcentaje de longitud de hueso tocando el implante fue incrementándose estadísticamente significativo a partir del día 15 post-tratamiento ($p=0.0265$) (Figura N° 24).

Figura N° 24: Porcentaje de longitud de hueso tocando el implante en relación a la longitud total del implante. (C=CONTROLES; I=INFECTADOS; ID=INFECTADOS/DESINFECTADOS)



El número de NFO fue mayor significativamente ($p=0.0173$) en los controles en relación a los tratamientos I e ID. Aunque el tratamiento ID a los 15 días mostró un ligero incremento en relación al tratamiento I (Figura 25, A y B).

Figura N° 25, A y B : Número de núcleos de formación ósea a los 15 días y 30 días post -tratamiento (media \pm EE). . (C=CONTROLES; I=INFECTADOS; ID=INFECTADOS/DESINFECTADOS)



La tabla N°1 muestra los valores correspondientes a NFO (*núcleos de formación ósea*),AHOI (*áreas de hueso oseointegrado*) y LHOI (*longitud de hueso oseointegrado*) a los 15 días post-tratamiento.

A los 30 días también se realizó otro tratamiento a parte de C, I e ID, llamado desinfectado (D). El número de NFO fue mayor estadísticamente significativo (P=0.0258) en tratamiento control en relación a los otros tres tratamientos realizados. La variable AHOI en el tratamiento (D), mostró diferencias estadísticamente significativas (p=0.0088) en relación a los controles y los ID, no así en relación a los I (Tabla N° 2). Mientras que LHOI tuvo un comportamiento similar en ID y D; siendo este último tratamiento diferente estadísticamente de C e I (p=0.0032) (Tabla N° 2).

Tabla N° 1: Media \pm EE de las diferentes variables estudiadas en relación a la formación ósea en los tratamientos aplicados a los 15 días. .

(C=CONTROLES; I=INFECTADOS; ID=INFECTADOS/DESINFECTADOS)

Variable	Tratamiento		
	C	I	ID
NFO	7.40 \pm 0.68	4.00 \pm 0.58	6.10 \pm 0.75
AHOI	5.26 \pm 1.29	2.45 \pm 0.54	6.19 \pm 1.26
LHOI	6.68 \pm 1.3	3.22 \pm 1.16	11.8 \pm 1.50

Tabla N° 2: Media \pm EE de las diferentes variables estudiadas en relación a la formación ósea en los tratamientos aplicados a los 30 días.

(C=CONTROLES; I=INFECTADOS; ID=INFECTADOS/DESINFECTADOS)

Variable	Tratamiento			
	C	I	ID	D
NFO	7.00 \pm 0.71	4.10 \pm 0.98	4.40 \pm 0.54	4.80 \pm 0.58
AHOI	7.19 \pm 2.38	2.19 \pm 0.77	6.63 \pm 0.97	3.27 \pm 0.51
LHOI	6.68 \pm 1.66	4.10 \pm 1.98	12.85 \pm 1.15	10.19 \pm 1.99

El análisis de componentes principales de los dos primeros componentes principales (variabilidad acumulada entre los dos ejes 97%) mostró una asociación entre las variables NFO y AHOI, y entre AHOI y LHOI. Los controles de los diferentes tiempos presentaron mayor número de NFO, mientras que tratamiento ID mostró una mayor área y longitud que los otros dos a los días 15 y 30 post-tratamiento (Figura 26). Se confirmó la asociación de estas variables por medio del Coeficiente de Spearman (no paramétrico) (Tabla 3).

Figura N° 26 : Análisis de componentes principales.

(C=CONTROLES; I=INFECTADOS; ID=INFECTADOS/DESINFECTADOS)

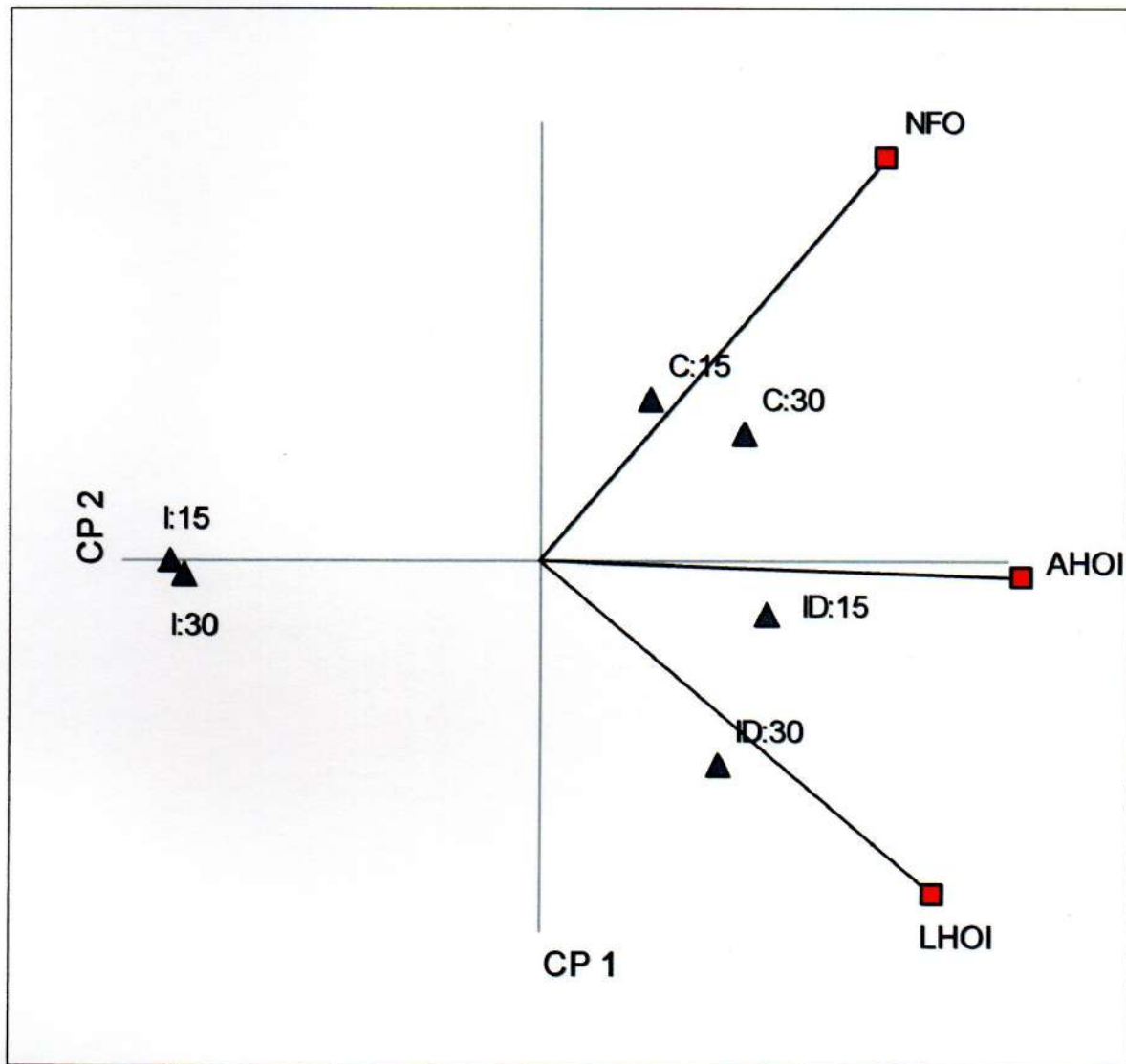


Tabla N° 3: Matriz de correlación, Coeficiente de Spearman. Coeficientes/ Probabilidades.

	AHOI	LHOI	NFO
AHOI	1,00000	0,00001^(*)	0,02186^(*)
LHOI	0,65879	1,00000	0,39708
NFO	0,34565	0,12767	1,00000

(*) Asociación estadísticamente significativa, fijando el valor $p < 0.05$



DISCUSIÓN

Es oportuno señalar que toda contribución al conocimiento de los mecanismos biológicos-moleculares que intervienen en la formación de hueso alrededor de un implante mejorarían las prácticas clínicas odontológicas referidas a la implantología.

Muchos autores han demostrado que las lesiones asociadas a placa bacteriana periodontopatógena son mas pronunciadas y ocupan un mayor volumen de tejido conectivo alrededor de los implantes que en elementos dentarios (9, 29).

La comprensión del ciclo síntesis / degradación de los tejidos circundantes en relación a infecciones microbiológicas del implante permitirá tratar en forma temprana patologías peri-implantarias, colaborando para el aumento de la longevidad de los implantes instalados.

Los implantes pueden estar sujetos a complicaciones de tipo mecánicas y/o biológicas, siendo estas últimas primordialmente de origen microbiológico (54). En pacientes edéntulos parciales es más frecuente observar infecciones en el surco peri-implantar, estas situaciones clínicas de no ser revertidas conducen al acortamiento de la longevidad del implante (55). Rosemberg y colaboradores en 1991 demostraron que implantes fracasados por una etiología primaria infecciosa se corresponden con una flora similar a la placa periodontopatógena (56).

Por esta razón elegimos un modelo experimental como el de "láminar test" ya que permite estudiar sólo el implante infectado o infectado/desinfectado frente a la médula óseo progenitora , con la finalidad de evitar la posible influencia de otras variables que sin duda deberían considerarse, a diferencia de diversos estudios con casos clínicos en humanos y en modelos experimentales en animales a los que se les

produjo peri-implantitis por inducción con ligadura de algodón en los que esos otros parámetros no se desecharon (29, 31, 34, 45, 57, 58).

Lehman y colaboradores (26) mencionan el riesgo probable de una colonización microbiana de la superficie implantaria asociada al defecto óseo en implantes que quedan conectados o expuestos al medio bucal cuando se los instala en una sola etapa quirúrgica. Estos implantes podrían responder post-quirúrgicamente con un tejido conectivo inflamatorio, sintomatología de supuración y sangrado y un incremento en la profundidad de bolsa por la exposición de las superficies implantarias a la placa bacteriana periodontopatógena. Por ello el protocolo quirúrgico "ad-modum Branemark" (1,2) aconseja, entre otras razones, dejar en una primera etapa los implantes sumergidos debajo de tejido conectivo. Por la misma razón a lo expresado anteriormente y en concordancia con otros investigadores (29) nosotros observamos en el grupo de implantes infectados resultados pobres de osteointegración.

Otro factor a tener en cuenta es que clínicamente sólo se puede posicionar nuevo hueso alrededor del implante mediante el uso de técnicas de regeneración ósea guiada (GBR). La exposición prematura de la membrana utilizada para contener el relleno óseo al utilizar GBR puede afectar la neo formación ósea y regeneración alrededor del implante tratados con ésta técnica lo cual es un hallazgo frecuente en modelos animales y humanos, como informa Noppe y colaboradores, en los cuales la bacteria gana acceso a los tejidos que están debajo de la membrana y perpetúa una reacción inflamatoria alrededor de los implantes, esta infección podría afectar y reducir el potencial regenerativo del hueso alveolar en las zonas tratadas (59).

La presencia de placa parece ser la responsable de los resultados insuficientes en el intento de lograr “re-oseointegración” en periimplantitis inducida por placa periodontopatógica por diferentes grupos de investigación (31, 34, 46, 60) y en periimplantitis utilizando técnicas de regeneración guiada (27, 59) y en los casos de implantes infectados con placa en este estudio . A diferencia de estos resultados la osteointegración obtenida por nosotros, en el grupo de implantes infectados/desinfectados son por que en este grupo experimental eliminamos las posibilidades de reinfeción al estar los implantes libres de placa.

Finalmente otra variable a tener en cuenta son las microfracturas óseas causadas por carga implantaria prematura, sobrecarga oclusal, algún tipo de trauma o factores oclusales (17, 59). Estos procesos se conocen también como “peri-implantitis retrograda“, y se caracterizan por una pérdida periapical de hueso sin al menos al principio, inflamación gingival o de la mucosa peri-implantaria (61) .

Recordemos que los tejidos peri-implantarios no responden igual que los elementos dentarios frente al estrés biomecánico por ello los implantes tienen un 10% menos movilidad que los elementos dentarios Frente a una sobrecarga las microfracturas del tejido óseo ocurren, y si se pierde la oseointegración (17), esto es irreversible. Además el área de soporte óseo o perímetro implantario es siempre menor al de los dientes naturales.

En los últimos 15 años los estudios sobre superficie implantaria han demostrado que la rugosidad superficial del implante oseointegrado influencia el anclaje óseo de un implante, mas aún, otros autores (60, 62, 63) han sugerido que existe una relación entre la textura superficial del implante y las reacciones del hueso marginal Estas superficies porosas o rugosidad superficial puede ser producida por múltiples

técnicas, ya sea sumando porosidad mediante el agregado de diversas partículas biocompatibles o restando superficialmente como las técnicas de grabado ácido. Lo importante es el mayor contacto entre el tejido óseo y la superficie del implante y el incremento de las fuerzas friccionales entre los dos cuerpos, disminuyendo la posibilidad de micromovimientos en la interfase. Se ha demostrado que la presencia de rugosidades o poros permite a las células migrar dentro de las mismas y en este ambiente, siempre que sean expuestas a niveles de tensión adecuados para la formación ósea, se promueve a una sólida traba mecánica (64, 65, 66, 67).

En la práctica actual de la implantología los implantes más usados son los que poseen una superficie texturada o rugosa y se recomienda dichas superficies para aquellas zonas en los maxilares que tienen una densidad ósea pobre, cuando debemos colocar implantes cortos o cuando queremos acelerar la utilización clínica del implante (57, 68, 69). En concordancia con lo expresado anteriormente nuestras muestras controles, las láminas de titanio implantadas, indujeron la formación de hueso laminar alrededor de los mismos, sin interposición de una capa de tejido conectivo. Estos resultados son similares a los observados por autores como Adell y colaboradores y Albrektsson y colaboradores en animales y en humanos (1, 2, 3).

Sin embargo en el grupo implantes I/D la cantidad de hueso osteointegrado fue similar a la de los grupos controles a pesar que la superficie del implante había sido pulida durante la desinfección. Esto está indicando de manera significativa el papel negativo de la flora microbiana en la formación ósea independientemente de la superficie implantaria. Las muestras infectadas presentaron una notable disminución de la oseointegración cuando se compararon los resultados de este grupo con los controles tanto a 15 como 30 días.

Estos resultados probablemente sean inducidos porque las infecciones provocadas por bacterias Gram-negativas anaerobias, como en nuestras muestras, desencadenan mecanismos de agresión que al superar la capacidad de respuesta defensiva de los tejidos producen cambios inflamatorios y en mayor o menor proporción destrucción tisular. Las endotoxinas de estas bacterias además, a través de la inducción de los macrófagos y la liberación de citotoxinas y lípidos, determinan reabsorción ósea al igual que el ácido lipoteicoico y la cápsula que también producen “in vitro” reabsorción ósea

El tejido óseo tipo laminar volvió a formarse alrededor del implante en los tratamientos infectados-desinfectados (ID) a diferencia de los infectados (I) y esto podría deberse a la remoción de los contaminantes realizada por el método de desinfección implementado probablemente porque se equilibra el ciclo de síntesis / degradación. Estudios realizados por otros autores demostraron que la aplicación de maniobras de asepsia sobre los implantes mejoraron la respuesta de formación ósea (29, 32, 34, 37, 56). En este estudio los valores alcanzados en ID superan a los controles (C) en la longitud de oseointegración pero no en el área de oseointegración pudiendo observarse una ligera disminución del volumen en los experimentales tratados.

La metodología de desinfección implementada consta de tres instancias: una mecánica, una química con ácido cítrico y un lavado final con solución fisiológica. La implementación conjunta de las tres modalidades de desinfección permite una correcta y efectiva remoción de todos los componentes biológicos y / o químicos que podrían estar interviniendo negativamente en la formación ósea.

Las técnicas mecánicas que han sido utilizadas por distintos autores para la remoción de microorganismos vivos , muertos y los componentes tóxicos derivados de las membranas bacterianas, van desde la utilización de sistemas de aire-polvo abrasivo, curetas puntas activadas por sistemas ultrasónicos, tazas de goma con pastas abrasivas, fresas de carburo y piedras diamantadas, entre otras (29, 31, 58, 70). Para el presente trabajo se utilizaron puntas de titanio en vez de las puntas convencionales de acero para no destruir la lámina implantaria, alterando lo menos posible la superficie y al tiempo propuesto de trabajo se podía observar macroscópicamente la superficie más lisa y brillante. Además este tratamiento fue complementado con la utilización de ácido cítrico que ha demostrado ser una sustancia muy eficaz para remover fragmentos orgánicos, endotoxinas y residuos lipopolisacáridos de origen bacteriano. El ácido cítrico posee un buen efecto desintoxicante sobre todo tipo de superficie y además puede penetrar en rugosidades superficiales si existieran, o hubieran quedado del tratamiento anterior (29, 36, 57).

La efectividad de esta limpieza pudo demostrarse en los resultados al encontrar una mayor longitud de hueso laminar en contacto con el implante en las muestras experimentales ID que la observada en las muestras I.

Las propiedades químicas y físicas de la superficie de un biomaterial afecta el material celular de la interfase e influencia los rasgos y características del hueso y los tejidos blandos alrededor de los implantes dentales (70).

Cuando un implante pierde la oseointegración, la superficie de titanio expuesta a la cavidad oral es cubierta por un biofilm (18). Éste al comienzo se dispone sobre el titanio como si fuera una película de fluido crevicular o de saliva y ocurre la colonización bacteriana (71). La cantidad y la maduración de la placa dental que

puede recubrir las superficies es mayor sobre las superficies rugosas (19, 70, 72) por ello no debería sorprender que el pulido de la porción expuesta a la cavidad oral para el tratamiento de la infección superficial de titanio puede resultar preventiva de la re-infección y que facilite los procedimientos de higiene oral en el caso que dicha superficie quedara expuesta a la cavidad bucal (29).

El número de NFO en los I e ID son similares, pero este valor no corresponde con la cantidad de hueso formada alrededor del implante, es decir resultan iguales en número pero en las muestras ID recubren prácticamente toda la superficie del implante 55-75% , mientras que las I sólo en un 14-30% de la misma (Figura N° 24).

Los controles presentaron mayor de número de NFO pero no recubrían todo el perímetro del implante. La rugosidad estándar del implante permite la formación de NFO en diversas zonas del mismo mientras que el aumento de rugosidad de la superficie del implante producida por la metodología llevada a cabo en este trabajo sería la causa de una oseointegración continuada y regular en el perímetro del mismo.

Finalmente considero que este aporte podría ser continuado en varias direcciones con propuestas que incorporen variaciones en el modelo experimental, por ejemplo, me pregunto cuales serían los resultados en términos de oseointegración en modelos con infección bacteriana y carga oclusal con esta propuesta metodológica de desinfección. Así también estos hallazgos podrían ser enriquecidos con otras superficies implantarias o bien con otros elementos o sistemas de desinfección.

CONCLUSIONES

1.-La implantación de una lámina de titanio con tratamiento superficial de grabado ácido en la médula osteoprogenitora indujo la formación de hueso laminar en su perímetro (o en más de un 50% del mismo) debido a que brinda un anclaje mayor a la migración celular.

2.-El modelo de Cabrini y colaboradores "Implant Test" resulta eficaz para estudiar el proceso de oseointegración en las condiciones experimentales aplicadas en este estudio.

2.-La infección con placa periodontopatígena de las láminas de titanio disminuye la formación de hueso laminar en el perímetro implantario

3.-La desinfección superficial de las láminas implantes laminares de titanio mejora la formación de hueso laminar en el perímetro implantario en forma significativa

4- En estas condiciones experimentales se confirma que la ausencia de placa periodontopatígena favorece la re-osteointegración independientemente de las características superficiales del implante.

5.-Resaltar la importancia del control de la placa bacteriana independientemente del tipo de implante utilizado.

Resumen

La desinfección de las superficies implantarias es una condición indispensable en la recuperación clínica de implantes afectados con peri-implantitis, aunque no existe aún coincidencia en el método a emplear. La desinfección de la superficie implantaria efficientiza la biocompatibilidad de los implantes en el lecho tisular óseo, induciendo el proceso de oseointegración.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta ósea por el efecto de la infección y desinfección de las superficies implantarias. Se utilizaron 40 ratas Wistar (de 90 g. \pm 10 grs. peso corporal) y se les colocó un implante laminar de titanio (Cabrini *et al.* 1993) en la médula osteogénica de ambas tibias derecha e izquierda del animal que se utilizaron como control y problema respectivamente. Las muestras fueron divididas en tres grupos, controles, infectadas con placa periodontopatógena, e infectadas y posteriormente desinfectadas con un método propuesto de ultrasonido y ácido cítrico. Los animales fueron sacrificados a los 15 y 30 días post-implante, se resecaron las tibias, radiografiaron y se incluyeron en metil metacrilato. Se obtuvieron cortes transversales y se colorearon con Azul de Toluidina. Se realizó el análisis histomorfométrico mediante un analizador de imágenes. Se evaluó el número de núcleos de formación ósea (NFO) peri-implantaria, el área de hueso oseointegrado (AHOI) con el implante, expresado en mm^2 , y la longitud de hueso oseointegrado (LHOI) con el implante expresado en mm.

Las mediciones realizadas a los días 15 y 30 de las variables antes mencionadas mostraron diferencias significativas entre los tratamientos realizados ($p < 0.05$) pero no entre los tiempos estudiados ($p > 0.05$). El área de hueso osteointegrado (AHOI) mostró un área mayor en el grupo de tratamiento infectado-desinfectado (ID) en relación al tratamiento infectado (I) ($p = 0.011$). Asimismo, los controles difirieron estadísticamente en relación al tratamiento de los infectados. En relación a LHOI se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos I e ID ($p = 0.002$), siendo mayor la longitud en el tratamiento ID. El número de NFO fue mayor significativamente ($p = 0.0173$) en los controles en relación a los tratamientos I e ID.

Los resultados obtenidos alentarían la utilización del método propuesto en el tratamiento de las infecciones peri-implantarias.

Palabras claves:

Oseointegración, infección implantaria, microbiología, peri-implantitis, implantes laminares, desinfección de la superficie implantaria, ácido cítrico, cavitador ultrasónico, re-oseointegración



Summary.

Implant desinfected surfaces must be a condition in clinical implant retrieving with peri-implantitis even though the authors do not seem in agreement with the method. The aim of this work was to evaluate the osseo formation in implant desinfected surfaces. Male wistar rats (n=40) body weight 90g. \pm 10 g. were used (Cabrini *et al.*, 1993). Titanium laminar implants were inserted into the osteogenic marrow of both right and left tibias of the animals used respectively as control and problem. The samples were divided in 3 groups: control, infected with bacterial periodonto pathogenic plaque and infected-desinfected with ultrasonic scaler and cytric acid. After 30 days of the implant instalation the animals were sacrificed . The tibias were dried , radiographed and embedded in methyl methacrylate. The transversal section samples were toluidine blue stained. Histomorphometric analysis was carried out by means of an image analyzer. The quantity of peri-implant bone formation nucleus (NFO), the area of osseintegrated bone (AHOI) to the implant expressed in mm² and the lenth of osseintegrated bone (LHOI) to the implant expressed in mm. was evaluated.

The measurments of these variables were performed on day 15th and 30th, showing significant differences among the treatments carried out ($p < 0.05$) but not regarding the times of study ($p > 0.05$). The area of osseointegrated bone (AHOI) showed a bigger area in the treatment group infected-desinfected (ID) compared to the infected treatment (I) ($p = 0.011$). Also the controls (C) differed statistically compared to the treatment of those infected (I). As regards to the length of osseointegrated bone there were statistically significant differences among the treatment I and ID ($p = 0.002$), showing bigger the length in treatment ID. The number of NFO was singnificantly higher ($p = 0.0173$) in the controls compared to the treatmens I and ID.

The obtained results would encourage the use of the proposed method in the treatment of the peri-implant infections.

Key words:

Osseointegration, infectius failure microbiology peri-implantitis laminar test, implant surface detoxification , citric acid, ultrasonic scaler infección, reosseointegration.

Bibliografía

1. Adell,R., Lekholm,U., Rockler,B. Bränemark,P-I. A 15-year study of osseointegration implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int Journal of Oral Surgery* 1981;10: 387-416.
2. Adell, R. Eriksson, B. Lekholm, U. Bränemark,P-I. Jemt, T. A long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral & Maxillofac Implants*. 1990; 5: 347-359.
3. Albrektsson,T. Zarb,G. Worthington, P. Eriksson,A.R. The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. *Int. J. of Oral & Maxillofac. Implants* 1986; 1: 1-25
4. Hansson,H.A. Albrektsson,T. Bränemark,P-I. Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. *J. Prosth. Dent.* 1983;50(1):108-1134.
5. Albrektsson,T. Direct bone anchorage of dental implants. *J of Prosth.Dent.* 1983; 50(2):255-261.
6. Porempa,J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontology* 2000. 2000; 24; 153-192.
7. Berglundh T. Lindhe J. Ericsson I. Marinello C.P. Liljemberg B. Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth.*Clinical Oral Implants Research*. 1991; 2: 81-90.
8. Lindhe J.Berglundh T.Ericsson I.Liljemberg B.Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin. Oral Impl. Res.* 1992; 3 : 9-16

9. Berglundh T. Lindhe J. Marinello C.P. Ericsson I. Liljenberg B. Soft tissue reactions to the novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clin Oral Impl. Res.* 1992; 3: 1-8.
10. Albrektsson T. Isidor F. Consensus report of session IV. In: Lang NP, Karring T. Eds. *Proceedings of the 1st. European Workshop of Periodontology.* London: Quintessence Publishing Co. Ltd., 1994; 365-369.
11. Rams TE. Roberts TW. Tatum H. Subgingival bacteriology of periodontally healthy and diseased human dental implants (abstract) . *J. Dent Res.* 1984; 63 (SpecIss):200
12. Mombelli A, Van Oosten, M.A.C. Schurch E. Lang N.P. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implantes. *Oral Microbiol. Immunol.* 1987; 2: 145-151.
13. Schou L. Holmstrup P. Hjørting-Hansen E. Plaque induced marginal tissue reactions of osseointegrated oral implants. *Clin Oral Implant Res.* 1993; 3: 149-161.
14. Kiname, D.F., Lindhe, J. *Periodontología clínica e Implantología Odontológica* .3ra Ed. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires - Argentina.”. 2001; 191-228.
15. Bascones, A. *Periodoncia clínica e Implantología oral.* Avances 2^a Ed. Madrid. 2001;:107-161.
16. Socransky, S.S. Haffagee, A.D. Cugini, MA. Smith, C. Kant, R.C. *Microbial complex in subgingival plaque.* *J. Clin. Periodontol.* 1998; 25:134-144.
17. Meffert R.M. *Periodontitis vs. Peri-implantitis: The same disease? The same treatment ?.* *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7 (3) : 278-291.

18. Gristina A.G. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987;237:1588-1595.
19. Quirynen,M. Van Der Mei, H.C. Bollen,C.M.L. Schotte,A. Marechal,M. Doornbusch,G.I. Naert,I. Busscher,H.J. and Van Steenberghe D. An “in vivo” study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra and subgingival plaque. *J Dent Res* 1993; 72(9):1304-1309.
20. Gatewood,R.R. Cobb,C.M. Killoy,W.J. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma sprayed dental implant surfaces.*Clin Oral Impl Res* 1993;4:53-64.
21. Sodek,J; McKee,M. Molecular and celular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000. 2000; 24: 99-126.
22. Lindquist, L.W. Rockler B. Carlsson G.E. Bone resorption around fixtures in edentulous patterns treated with mandibular fixed tissue integrated prostheses. *J Prosth Dent.* 1988; 59:59-63.
23. Becker W. Dahlin C. Becker B.E. Leckholm U. Van Steenberghe D. Higuchi K. Kultje C The use of e-PTFE membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraraction sockets: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994; 9: 31-40.
24. Nyman S. Lang NP. Buser D. Bragger U. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guide tissue regeneration: a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1990 ; 5: 9-14.

25. Ong E.S.M. Newman H.N. & Bulman J.S. The occurrence of periodontitis-related microorganisms in relation to titanium implants. *Journal of Periodontology*. 1992; 63: 200-205.
26. Lehmann B. Brägger U. Hämmerle C.H.F. Fourmoussis I. Lang N.P. Treatment of an early implant failure according to the principles of guided tissue regeneration (GTR). *Clin Oral Implants Res*. 1992; 3: 42-48.
27. Grunder U. Hürzeler M. Schüpbach P. Strub J. Treatment of ligature-induced peri-implantitis using guided tissue regeneration: A clinical and histologic study in the beagle dog. *Int J Oral maxillofac Implants* 1993; 8; 282-293.
28. Jovanovic S. Spiekermann H. Richter E-J. Koseoglu M. Guided tissue regeneration around titanium dental implants. In: Laney W.R. Tolman D.E. (eds.) *Tissue integration in Oral, Orthopedic, and Maxillofacial Reconstruction*. Chicago: Quintessence, 1992: 208-215.
29. Jovanovic S A. Barrie Kenney E. Carranza F.A. Donath K. The Regenerative Potential Of Plaque-induced peri-implant bone defects treated by a submerged membrane technique: An experimental study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993; 8: 13-18.
30. Mellonig J.T. Griffiths G. Mathys E. Spitznagel Jr. J. Treatment of the failing implant: Case reports. *Int J periodont Res Dent*. 1995; 15: 385-395.
31. Ericsson I. Persson L.G. Berglundh T. Edlund T. & Lindhe J. The effect of antimicrobial therapy on periimplantitis lesions. An experimental study in the dog. *Clin. Oral Implants Res*. 1996; 7: 320-328.
32. Hürzeler M.B. Quiñones C.R. Schüpbach P. Morrison E.C. Caffesse R.G. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts,

- alone or in combination, in beagle dogs. Part 2: Histologic findings. *Int J.Oral Maxillofac Implants*. 1997; 12: 168-175.
33. Persson L.G. Araújo M.G. Berglundh T. Gröndahl K. Lindhe J. Resolution of peri-implantitis following treatment. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* .1999; 10: 195-203.
34. Wetzel A.C. Vlassis J.Caffesse R.G. Hämmerle Ch.H.F. Lang N.P Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 1999; 10: 111-119.
35. Dennison D.K. Hürzeler M.B. Quiñones C. & Caffesse R.G. Contaminated implant surfaces: An in vitro comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination. *Journal of Periodontology*. 1994; 65: 942-948.
36. Mouhyi J.Sennerby L.Pireaux J.J.Dourov N.Nammour S.Van Reck J. An XPS and SEM evaluation of six chemical and physical techniques for cleaning of contaminated titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 1998; 9: 185-194.
37. Parham P.L. Cobb C.M. French A.A. Love J.W. Drisko C.L. Killoy W.J. Effects of an air.powder abrasive system on plasma sprayed titanium implant surfaces: An in vitro evaluation. *Journal Of Oral Implantology* 1989; 15: 78-86.
38. Oyster K.O. Parker W.B. Gher M.E. CO₂ lasers and temperature changes of titanium implants. *Journal of Periodontology*. 1995; 66: 1017-1024.
39. Mouhyi J. Sennerby L. Nammour S. Guillaume P.Van Reck J. Temperature increases during surface decontamination of titanium implants using CO₂ laser. *Clin Oral Implants Res*. 1998 ; 10: 54-61.

40. Eriksson, A., Albrektsson, T.: Temperature threshold levels for heat induced bone tissue injury: A vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent* .1983; 50:101-105.
41. Quirynen M. Naert I. van Steenberghe D.. Fixture design and overload influence marginal bone loss and fixture success in the Bränemark System. *Clin Oral Implants Res* 1992; 3: 104-111.
42. Rangert B. Krogh P.H.J. Langer B.Van Roekel N. Bending overload and implant fracture: A retrospective clinical analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* .1995; 10: 326-334.
43. Ahlquist J. Borg K. Gunne J. Nilson H. Olsson M. Astrand P. Osseointegrated implants in edentulous jaws: A 2-year longitudinal study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990; 5:155-163.
44. Becker W. Becker B. Newman M. Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990; 5: 31.38
45. Wetzel A. Vlassis J. Caffesse R.G. Hämmerle C.H.F. Lang N.P. Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* 1999; 10: 111-119.
46. Singh, G. O'Neal, R.B. Brennan, W.A. Strong, S.L. Horner, J.A. Van Dyke, T.E. Surgical Treatment of induced peri-implantitis in the micro pig: Clinical and Histological Analysis. *J Periodontol* 1993; 64:984-989.
47. Cabrini R.L. Guglielmotti M.B. Almagro J.C. Histomorphometric of initial bone healing around zirconium implants in rats. *Implant Dent*. 1993; 2(4): 264-267.

48. National Institute of Health (NIH). NIH Publication Rev. 1985; 9: 85-23.
49. Guglielmotti M.B. Renou S. Cabrini R.L. Evaluation of bone tissue on metallic implants by energy-dispersive X-ray analysis: an experimental study. *Implant Dent* 1999; 8(3):303-309.
50. Guglielmotti M.B. Renou S. Cabrini R.L. A Histomorphometric study of tissue interface by laminar implant test in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14: 565-670.
51. Quirynen M., Litsgarten M.A. (1990). The distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Bränemark. *Clin.Oral Impl Res* 1990; 1: 8-12.
52. Guía Práctica para el procesamiento de muestras clínicas. SABADEC. División AAM. Subcomisión Anaerobios (1995).
53. Zambon,J.J. Horoszky,V.I. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontol.* 2000. 1995; 7:69-82.
54. Lang,N.P. Wilson,T.G. Corbet, E.F. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment.*Clin Oral Impl Res* 2000;11 (Suppl.): 145-155.
55. Mombelli,A. Buser,D. Lang N.P. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients.early results. *Oral Microbiology and Immunology* 1988; 3: 113-120.
56. Rosemberg E.S. Torosian J.P. Slots, J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implan Res* 1991;2 :135.144.

57. Deporter,D.A. Todescan,R.Jr. A possible "Rescue " procedure for dental implants with a textured surface geometry: A case report.J Periodontol 2001; 72 :1420-1423.
58. Gantes B.G. Nilveus,R. The effect of different hiene instruments on titanium surfaces: SEM observations. Int J Periodont Rest Dent 1991; 11: 225-239.
59. Noppe C. Wachtel H.C. Bernimoulin J.P. Ebert-Kayser K. Eiheinlung von e-PTFE-Membranen. Deutsche Zahnarztl Z 1990;45:617-620.
60. Gotfredsen K. Berglundh, T Lindhe, J Bone reactions adjacent to titanium implants with different surface characteristics subjected to static load.A study in the dog (II) .Clin Oral Imppl Res 2001;12:196-201.
61. Misch C.E. Effect on treatment plans, surgical approach healing and progressive loading. Int J Oral Implant 1990; 6: 23-31.
62. Buser,D. Schenk R.K. Steinemann S. Fiorellini J.P. Fox,C.H. Stich,H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. Ahistomorphometric study in miniature pigs. Journal of Biomedical Materials research 1991; 25: 889-902.
63. Al-Sayed,A. Deperter,D.A. Pilliar,R.M. Watson,P.A. Berhane, K. Carter, S. Predicable crestal bone remodelling around two porous-coated titanium alloy dental designs. A radio-grphic study in dogs. Clin Oral Impl Res 1994; 5: 131-141.
64. Wennerberg A. Albrektsson T. Suggested Guidelines for the topographic evaluation of dental surfaces.Int J oral Maxillofac Implants 2000; 15: 331-344.

65. Kieswetter K. Schwartz,Z. Dean,D.D. Boyan,B.D. The role of implants surface characteristics in the healing of bone. Clin Rev Oral Biol Med 1996; 7(4); 329-345.
66. Klokkevold,P.R.Russell,D.Nishimura,M.A.Caputo.Osseointegration enhanced by chemical etching of titanium surface. A torque removal study in the rabbit. Clin Oral Impl res 1997;8:442-447.
67. Khang,W. Feldman,S. Hawley,C.E. Gunsolley,J. A multicenter study comparing dual acid-etched and machined surfaced implants in various bone qualities. J Periodontol 2001;72:1384-1390.
68. Brunski J.B.Puleo D.A. Nanci A.Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: Current status and future developments.Int J oral Maxillofac Impl 2000;15:15-46.
69. Pilliar R.M. Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous-surface designs.Impl Dent 1998;7:305-314.
70. Rimondini,L. Cicognani Simoncini,F. Carrassi,A.micro-morphometric assessment of titanium plasma-sprayed coating removal using burs for treatment of prei-implant didease.Clin Oral Impl Res 2000;11:129-138.
71. Carrassi A. Sardella,A. Rimondini,L. In-vivo early plaque colonization on smooth titanium surface. Cells and Materials. 1996;6:111-116.
72. Siegrist B.E. Brex,M.C. Gusberti, F.A.JossA. Lang,N.P. In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. Clin Oral Impl Res 1991 ;2 :38-46.





UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA
Facultad de Odontología

Certifico por este instrumento que en el laboratorio de Microbiología del Area de Biología Oral (A.B.O) el que suscribe supervisó y dirigió la faz experimental del proyecto de tesis doctoral del Od. Alejandro Jorge Filsinger en lo referente a cultivos, aislamiento e identificación de las bacterias periodontopatógenas incluidas en dicho proyecto.

Se extiende el presente certificado a los siete días del mes de Diciembre de 2005, a efectos de ser presentado al Tribunal de Tesis Doctoral a su requerimiento.



Dr. LUIS A. OLMEDO
PROFESOR TITULAR
CATEDRA 4- MICROBIOLOGIA

Prof. Dr. Luis Augusto Olmedo
Titular Cátedra de Microbiología
Facultad de Odontología U.N.C



AREA DE BIOLOGÍA ORAL (ABO)



Sector de Microscopía y Análisis de Imágenes

Certifico que el **Od. Filsinger, Alejandro Jorge** ha realizado en estas instalaciones las mediciones correspondientes a **80 muestras** para análisis de **Oseointegración de Laminillas de Titanio en Tibias de Ratas**, con su respectivo **Análisis Estadístico**. Este trabajo fue realizado en los periodos 2003 - 2004 y 2005.

Se realiza el presente Certificado a los 19 días del mes de Diciembre de 2005, para ser presentado ante quién corresponda.

Karim Alejandra Nemer Pelliza
Ing. en Sistemas de Información