



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**Evaluación biológica de nuevos recubrimientos
osteointductores sintetizados vía sol-gel para
aplicación en implantología dental**

Tesis Doctoral presentada por

Irene Lara Sáez

para optar a grado de Doctor

por la Universidad Politécnica de Valencia

Director de Tesis Doctoral:

Julio José Suay Antón

Tutora de Tesis Doctoral:

Lynne Paula Yenush

Valencia, 9 de Abril de 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecer a mi Director de Tesis, Julio Suay, la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral y de enseñarme cómo es el mundo de la investigación. También agradecer a Mariló Gurruchaga y a Isabel Goñi estos años compartidos juntos en el proyecto SOLDENT.

Quería agradecerle muy especialmente al Dr. Antonio López Bravo, “mi co-director en la sombra”, el haberme enseñado a mirar con otros ojos todo lo que sucede no sólo en el hueso, sino alrededor de él. Gracias por acogerme en Ávila. Gracias también a Juan, por su ayuda.

Mi tutora en la Universidad Politécnica de Valencia ha sido Lynne Yenush, cuyo interés en su trabajo y su efectividad han sido claves para hacer que todo el proceso burocrático de esta Tesis haya sido más fluido, fácil y agradable. Gracias Lynne!

Recordar al resto de compañeros tanto de Castellón (grupo PIMA) como del País Vasco (María Jesús y María). Agradecerles a Raquel y a Pepe todo el esfuerzo que realizaron peleando junto a mí con las muestras, gracias por vuestra ayuda, vuestros consejos, vuestro humor y vuestro apoyo. A Javi, que siempre se acordará de mis dichosos huesos con los que no había forma de aclararse en el SEM. A Montse y a Ane por hacer piña para desahogarnos.

A José Luis Ribelles por acogerme como un miembro más del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tissular (CBIT). A Miriam por introducirme no sólo en la red sol-gel, sino en la vida social del CBIT. A todos mis compañeros y amigos con los que he compartido buenos y no tan buenos momentos y de los que tanto he aprendido, habéis sido mis verdaderos maestros. A *Fagocitosis tardía*, a *Suelo y cielo pélvico*, ¡a las cenas en el Fuji!

A Isabel y Víctor porque gracias a todo lo que aprendí con vosotros en el Instituto de Biomecánica de Valencia, tuve la oportunidad de enfrentarme sola a este reto. A Patricia Rico y a José Luis Peris por vuestra enorme aportación al investigador que soy hoy en día.

A Sara, porque una causa común une mucho, ¿verdad? Gracias por la buena compañía que has sido en este largo camino, por tus buenos consejos y por todo lo que hemos aprendido juntas.

A *Nosotras....por fin 11* y a todos mis amigos que me han servido de ejemplo para avanzar y superarme para conseguir lo que quiero. A Amparo, a Juanfran y a Víctor por ser verdaderos amigos. Al círculo ¡mil gracias! A Piña y Coco.

A mi madre y a mi padre, sin los cuales no sería quién soy. Gracias por la educación que me habéis dado y por todo vuestro cariño y apoyo. Espero que os sintáis orgullosos de mí. A mi tete, ya sabes por qué. A mi Güeli que me ha recordado lo importante que es tener cerca a la gente que te quiere. A *Primo perche lavorare bene, essere nobile e vivere secondo i propri principi, ne vale la pena*. A toda mi familia, la española y la italiana. A todos, siento haber estado un poco más ausente de vuestras vidas este último año.

Por último, la parte más importante de este trabajo, la que no se ve, se la debo a Stefano. Gracias por apoyarme, cuidarme, sufrirme y animarme todos los días, por enseñarme que hay cosas en la vida por las que no vale la pena sufrir, por hacerme ver todo lo que valgo, TVTTB!

*A mi familia
A Stefano*

ÍNDICE

RESUMEN	5
RESUM	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	9
1. Biología del hueso y del diente.....	9
1.1. Histología del hueso	9
1.3. Remodelado óseo.....	19
1.4. Regeneración ósea	21
1.5. Biología del diente	22
2. Implantología oral.....	24
2.1. Titanio.....	24
2.2. Osteointegración de implantes dentales	27
2.2.1. Proceso de osteointegración de un implante dental.....	28
2.3. Factores que determinan el éxito de la implantación	31
2.3.1. Del implante (o estabilidad primaria).....	32
2.3.2. Del hueso (estabilidad secundaria)	36
2.3.3. Del paciente (enfermedades)	36
3. Biovidrios y recubrimientos sol-gel	37
3.1. Proceso sol-gel	38
3.2. Papel de la sílice en la regeneración ósea.....	40
3.3. Funcionalización de la red sol-gel.....	43
4. Evaluación biológica de implantes dentales	51
4.1. Definición de biocompatibilidad.....	51
4.1.1. Evaluación biológica sobre cultivos celulares	54
4.1.1. Evaluación biológica tras la implantación <i>in vivo</i>	57
4.2. Osteointegración	59
4.2.1. Modelos animales	59
4.2.2. Histomorfometría	61
4.2.3. Evaluación de la osteointegración de materiales sol-gel.....	64
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	66

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS	68
1. Síntesis sol-gel y recubrimiento	68
1.1. Síntesis de los recubrimientos	68
1.2. Recubrimiento de las muestras	70
1.3. Curado de las muestras	72
2. Caracterización físico-química	74
2.1. Rugosidad	74
2.2. Hidrofilia	77
2.3. Bioactividad	78
2.4. Degradación	80
2.5. Liberación	82
2.6. Adherencia al sustrato	82
3. Caracterización biológica	83
3.1. Evaluación biológica sobre cultivo celular	83
3.1.1. Citotoxicidad por extracto	85
3.1.2. Adhesión y proliferación	86
3.1.3. Diferenciación	91
3.1.4. Tratamiento de datos	95
3.1.5. Morfología celular	97
3.2. Evaluación biológica tras la implantación <i>in vivo</i>	98
3.2.1. Implantación <i>in vivo</i>	98
3.2.2. Evaluación de la respuesta de reacción a cuerpo extraño	110
3.2.3. Evaluación de la osteointegración	112
3.2.4. Degradación sol-gel <i>in vivo</i>	117
CAPÍTULO 4. RESULTADOS DE LA <i>Fase de Caracterización I</i> : CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS FORMULACIONES	123
1. Síntesis y deposición	129
2. Caracterización físico-química	132
2.1. Rugosidad	133
2.2. Hidrofilia	135
2.3. Degradación	136
2.4. Liberación	137
2.5. Adherencia al sustrato	138
3. Caracterización biológica	139

3.1. Evaluación biológica sobre cultivo celular	139
3.1.1. Citotoxicidad por extracto	139
3.1.2. Adhesión.....	140
3.1.3. Proliferación.....	141
3.1.4. Diferenciación	142
3.2. Evaluación biológica tras la implantación <i>in vivo</i>	143
3.2.1. Evaluación de la respuesta de reacción a cuerpo extraño.....	146
3.2.2. Osteointegración.....	155
3.2.3. Degradación sol-gel <i>in vivo</i>	172
4. Discusión	178
5. Conclusión	185
CAPÍTULO 5: RESULTADOS DE LA <i>Fase de Caracterización II</i> : ESTRATEGIAS DE MEJORA.....	187
1. Síntesis sol-gel y recubrimiento.....	187
2. Caracterización físico-química	190
2.1. Rugosidad.....	190
2.2. Hidrofilia	193
2.3. Degradación	194
2.4. Liberación.....	196
2.5. Bioactividad.....	197
2.6. Adherencia al sustrato.....	198
3. Caracterización biológica.....	200
3.1. Evaluación biológica sobre cultivo celular	200
3.1.1. Citotoxicidad por extracto	200
3.1.2. Adhesión.....	201
3.1.3. Proliferación.....	213
3.1.4. Diferenciación	215
3.2. Evaluación biológica tras la implantación <i>in vivo</i>	219
3.2.1. Evaluación de la respuesta de reacción a cuerpo extraño.....	221
3.2.2. Evaluación de la osteointegración.....	228
3.2.3. Degradación sol-gel <i>in vivo</i>	247
4. Discusión	248
5. Conclusión	253
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	254

BIBLIOGRAFÍA	256
ANEXO 1	276
ANEXO 2	386
ANEXO 3	414

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se llevó a cabo la evaluación biológica de nuevos recubrimientos híbridos (orgánico-inorgánico), sintetizados vía sol-gel, basados en precursores de silicio, como recubrimientos osteointegradores y osteoinductores aplicados a prótesis radiculares de titanio en el ámbito de la implantología dental.

La evaluación biológica de los nuevos recubrimientos constó de un estudio completo para determinar el efecto de los recubrimientos sobre cultivos celulares de linaje osteoblástico y el efecto de los tejidos tras la implantación *in vivo* en tibia de conejo (respuesta de reacción a cuerpo extraño y osteointegración), mediante estudio histológico. La caracterización biológica se complementó con una caracterización físico-química de los materiales, determinando su topografía, su mojabilidad, la reactividad de su superficie, así como su grado de degradación y la liberación de silicio, para explicar el comportamiento biológico que cada uno de los materiales indujo.

Los recubrimientos que presentaron un mejor comportamiento celular fueron seleccionados como materiales candidatos para llevar a la fase de implantación *in vivo*. Este trabajo constó de dos fases experimentales; (1) la **Fase de Caracterización I** de la que se extrajo una formulación prototipo, sobre la cual se realizaron mejoras químicas evaluadas en la (2) **Fase de Caracterización II**, de la cual fue elegido el recubrimiento prototipo final.

Se obtuvieron recubrimientos degradables en cuya degradación hidrolítica liberaron compuestos de silicio que indujeron la osteointegración de los implantes recubiertos mediante osteogénesis a distancia, sin interferir en el proceso de osteointegración del titanio. Los nuevos recubrimientos ofrecen la posibilidad de funcionalizar la superficie del titanio y servir de vehículo de liberación de biomoléculas y fármacos que puedan mejorar y acelerar el proceso de osteointegración del titanio.

RESUM

En aquesta Tesi Doctoral es va dur a terme l'avaluació biològica de nous recobriments híbrids (orgànic-inorgànic), sintetitzats via sol-gel, basats en precursors de silici, com recobriments osteointegradors i osteoinductors aplicats a pròtesis radiculars de titani en l'àmbit de la implantologia dental.

L'avaluació biològica dels nous recobriments va constar d'un estudi complet per determinar l'efecte dels recobriments sobre cultius cel·lulars de llinatge osteoblàstic i l'efecte dels teixits després de la implantació *in vivo* en tèbia de conill (resposta de reacció a cos estrany i osteointegració), mitjançant estudi histològic. La caracterització biològica es va complementar amb una caracterització fisicoquímica dels materials, determinant la seva topografia, la seva mullabilitat, la reactivitat de la seva superfície, així com el seu grau de degradació i l'alliberament de silici, per explicar el comportament biològic que cada un dels materials va induir.

Els recobriments que van presentar un millor comportament cel·lular van ser seleccionats com materials candidats per portar a la fase d'implantació *in vivo*. Aquest treball va constar de dues fases experimentals; (1) la **Fase de Caracterització I** de la qual es va extreure una formulació prototip, sobre la qual es van realitzar millores químiques avaluades en la (2) **Fase de Caracterització II**, de la qual va ser elegit el recobriment prototip final.

Es van obtenir recobriments degradables, en la seva degradació hidrolítica van alliberar compostos de silici que van induir l'osteointegració dels implants recoberts mitjançant osteogènesi a distància. Els nous recobriments ofereixen la possibilitat de funcionalitzar la superfície del titani i servir de vehicle d'alliberament de biomolècules i fàrmacs per poder millorar i accelerar el procés d'osteointegració del titani.

ABSTRACT

In this Doctoral Thesis, the author carried out the biological evaluation of new silicon-based hybrid (organic-inorganic) coatings, synthesized by sol-gel route, used as osseointegrator and osteoinductor coatings applied to titanium radicular prosthesis in the dental implantology field.

The biological evaluation of the new coatings consisted of a complete study to determine the effect of the coatings in the osteoblastic cell line and the tissular effects after the *in vivo* implantation in rabbit tibia (foreign-body reaction response and osseointegration), by histological study. The biological characterization was complemented with a physicochemical characterization of the materials, determining their topography, wettability, surface reactivity, as well as their degradation rate and silicon delivery, to explain the biological behaviour that each material induced.

The coatings that showed a better cell behaviour were selected as material candidates for the *in vivo* implantation phase. This part of the work consisted of two experimental phases: (1) **Characterization Phase I**, from which one formulation prototype was obtained, and (2) **Characterization Phase II**, where different chemical improvements of the prototype were evaluated and a final coating prototype was selected.

The degradable coatings that were obtained released silicon compounds during their hydrolytic degradation, inducing the implant osseointegration by distance osteogenesis. The new coatings offer the possibility to functionalize the titanium surface and serve like delivery vehicle of biomolecules and drugs that could improve and accelerate the titanium osseointegration process.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. Biología del hueso y del diente

El hueso es un tejido conectivo especializado que conjuntamente con el cartílago forma el sistema esquelético. Tiene tres funciones principales: mecánica (soporta el cuerpo y es zona de unión de la musculatura), protectora (de los órganos vitales y la médula ósea) y metabólica (como reserva de iones, especialmente calcio y fosfato, y de proteínas)[1].

1.1. Histología del hueso

Desde un punto de vista histológico, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, dinámico y en constante cambio a lo largo de la vida de un organismo, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide (matriz colágena) calcificada [2]. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical (compacto) o esponjoso (trabecular) [3]. Ambos están constituidos por osteonas. Las osteonas del hueso cortical o compacto están formadas por conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica, donde se sitúan los osteocitos (Figura 1) que están comunicados entre sí por los canalículos (en las diáfisis de huesos largos y en los platillos vertebrales). Los osteocitos se comunican con el periostio y el endostio (revestimiento externo e interno del hueso, respectivamente) por los conductos de Volkmann. La osteona del hueso esponjoso o trabecular presenta una forma discoidal (sin conductos de Havers ni Volkmann) constituida por laminillas óseas (lamelas) dispuestas de forma paralela, formando en conjunto una red que delimita cavidades areolares en cuyo interior se encuentra la médula ósea (en las epífisis de huesos largos y en los cuerpos vertebrales) [4, 5]. Por su morfología, el hueso trabecular no es una base estable para la fijación primaria de un implante, sólo el hueso cortical proporciona una base estable para esta fijación temprana [6]. Cuando esta orientación laminar, presente tanto en el hueso cortical como en el trabecular, se pierde y el colágeno se dispone en forma aleatoria, tal tipo de hueso se llama "hueso trenzado" (del inglés *woven bone*). Este último tipo óseo es de menor resistencia a la fractura y es típico observarlo en situaciones de gran actividad metabólica del hueso, como en la reparación de fracturas, enfermedades óseas metabólicas (osteogénesis imperfecta, hiperparatiroidismo, enfermedad de

Paget) o tumores. Tanto el hueso cortical como el esponjoso están compuestos por una componente celular de células especializadas, una matriz orgánica y una fase mineral.

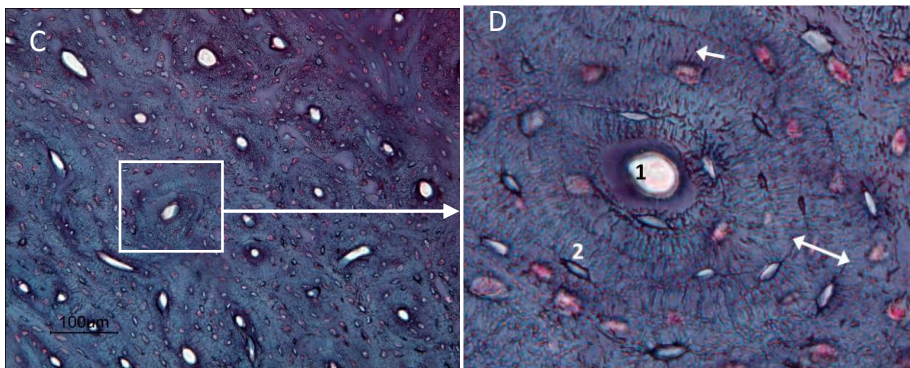
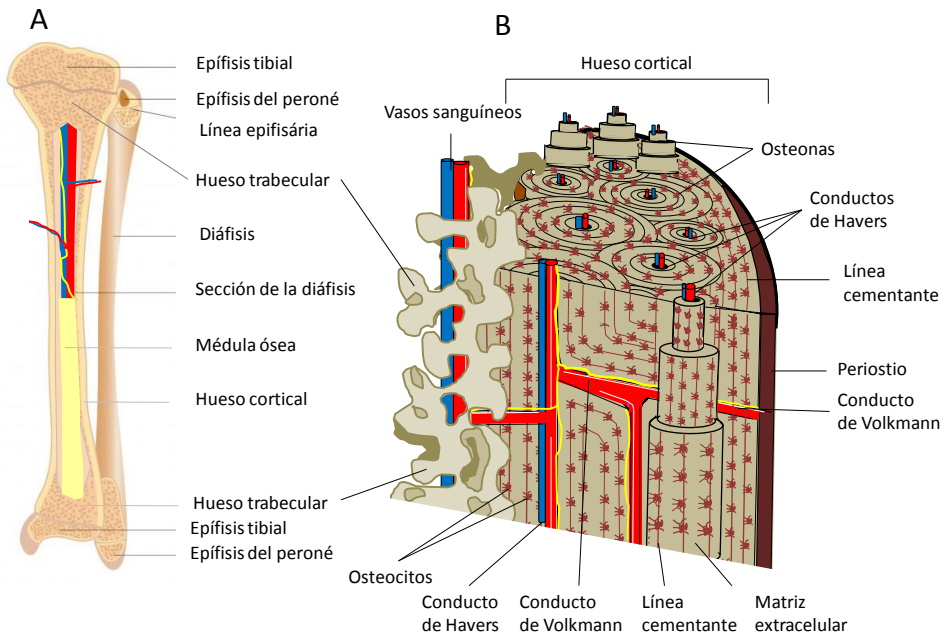


Figura 1. Estructura del hueso tibial y organización de las osteonas. (A) Esquema de las partes de la tibia y el peroné; (B) esquema de la organización del hueso tibial en una sección transversal de su diáfisis proximal; imagen de microscopía óptica (20X, Tricrómico de Gomori) de la sección transversal de tibia de conejo (C y D) donde se muestra la estructura del hueso cortical (C) y la estructura de una osteona (D) donde se señala el conducto de Havers (1), una laguna (2), el espesor de la lamela (flecha con dos cabezas) y los canalículos (flecha).

Componente celular

Las células óseas se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales

indiferenciadas (células madre mesenquimales). Estas **células madre mesenquimales** pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas (Figura 2): fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes [7].

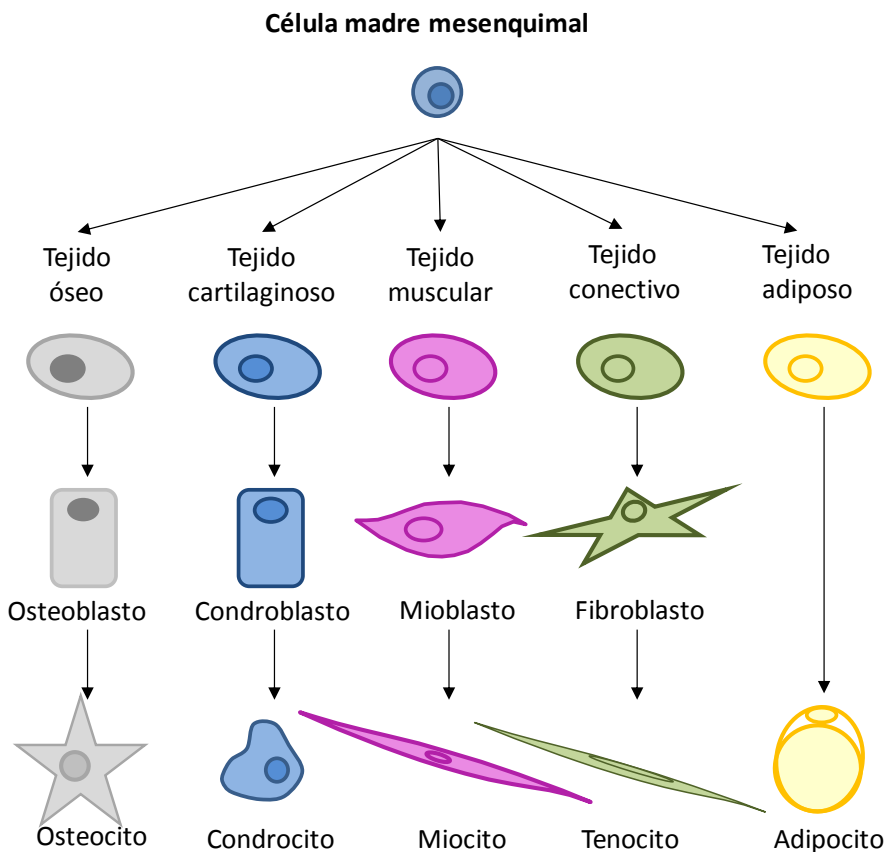


Figura 2. Estirpes celulares originadas por la diferenciación de células madre mesenquimales (inspirado en [8]).

La diferenciación hacia la estirpe osteoblástica está controlada por genes de la familia *Hedgehog*, siendo también reguladores esenciales el factor de transcripción *Cbfa1* (*Core-binding factor a-1*, también llamado *Runx2*, *Runt-related transcription factor 2*) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs, *Bone morphogenetic proteins*). A medida que las células precursoras se van diferenciando, expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función (marcadores). La expresión de *Runx2* es la primera evidencia de la diferenciación osteogénica, cuyo máximo nivel se alcanza en los pre-osteoblastos. El colágeno de tipo I (COL1) y la osteopontina (OPN), se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras. Igualmente, la fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína de superficie que participa en la regulación de la proliferación,

migración y diferenciación de las células osteoblásticas y, junto con la sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del preosteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización (Figura 3).

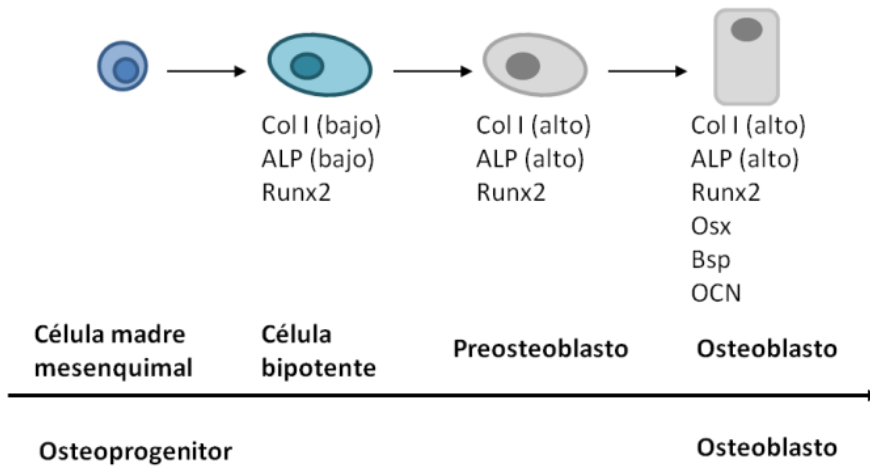


Figura 3. Diferenciación de osteoblastos [9].

Los **osteoblastos** son las células responsables de la formación ósea y del mantenimiento de la arquitectura esquelética. Su función principal es la síntesis y deposición de las proteínas de la matriz del hueso (osteoide) (Figura 4). Son células poliédricas con núcleos redondos y citoplasma basófilo que normalmente se encuentran en la superficie ósea (periostio y endostio), formando una única monocapa adherente. Los osteoblastos activos presentan las características de una célula secretora con un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático rugoso de gran tamaño [1, 7]. Son células polarizadas que presentan el núcleo celular en posición distal respecto a la superficie celular, poseen regiones especializadas de la membrana plasmática, modificada para el tráfico y la secreción vesicular y para establecer uniones con los osteoblastos adyacentes [1]. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, del endostio, del periostio y de los pericitos perivasculares. Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos. Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica (osteoide) a un ritmo de 2 a 3 μm por día.

Las funciones conocidas de los osteoblastos son: sintetizar las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, dirigir la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, contribuir a la mineralización de la sustancia osteoide (gracias a la fosfatasa alcalina), mediar en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y sintetizar factores de crecimiento.

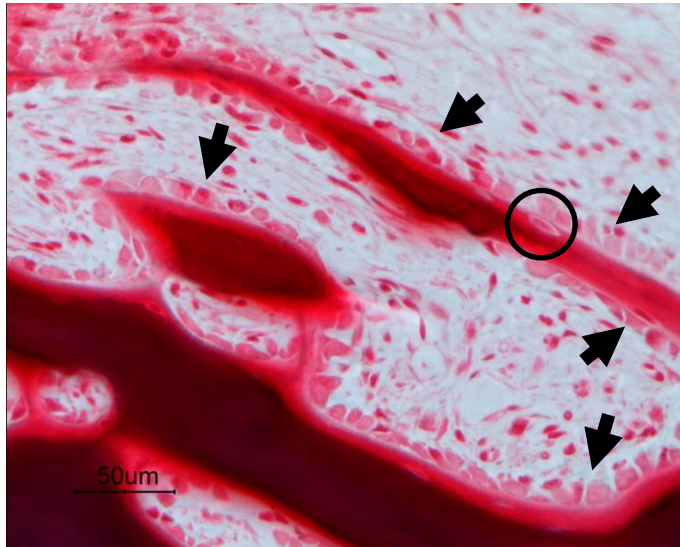


Figura 4. Espículas activas con frente de osteoblastos (flechas) y osteoblasto maduro encerrado en la matriz osteoide (circulo) en la formación de nuevo hueso trabecular alrededor de un implante. Imagen de microscopía óptica de sección transversal de tibia de conejo (40X, Tricrómico de Gomori).

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o en osteocitos. Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración. Las **células limitantes** (o de revestimiento) son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso, sin apenas orgánulos. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos anteriormente citados, así como el receptor de parathormona (PTH). Permanecen a lo largo de la superficie endóstica constituyendo, junto con el endostio, una capa protectora de la superficie ósea que juega un papel muy importante en la activación del remodelado óseo [7, 10]. Del 5 al 20% de los osteoblastos maduros quedarán enterrados en la matriz osteoide quedando atrapados en el proceso de mineralización, dando lugar a osteocitos (Figura 4 circulo). Los **osteocitos** forman el 90% de las células del tejido óseo y constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica, siendo incapaces de renovarse [11]. Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de las lagunas. Sus procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos, que están llenos de fluido óseo extracelular [1, 7].

Los osteocitos expresan muchos de los genes de osteoblastos, incluyendo los factores de transcripción y las proteínas específicas de osteoblastos, aunque los niveles de expresión son diferentes. En los osteocitos, la expresión de ALP y COL1 es menor mientras que la expresión de OCN aumenta. Otro gen que aparece expresado

preferencialmente en osteoblastos es el gen de la sialoproteína de unión a integrina (*integrin binding sialoprotein*, IBSP). Los osteocitos, por otro lado, son más ricos que los osteoblastos en la expresión de genes relacionados con la mineralización y el metabolismo de fosfato, incluyendo la endopeptidasa neutral reguladora de fosfato (Phex), la proteína 1 de matriz de dentina (DMP1), la fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE) y el factor 23 de crecimiento de fibroblastos (FGF23).

La función principal de los osteocitos es la de controlar el remodelado óseo, detectando variaciones mecánicas de las cargas (fenómeno denominado mecanotransducción), mediante la coordinación de la función de osteoblastos y osteoclastos. Los osteocitos emiten procesos dendríticos citoplasmáticos que corren a lo largo de los estrechos canalículos dentro de la matriz mineralizada, alcanzando las superficies del periostio y del endostio del hueso cortical, así como las superficies adyacentes a la médula ósea en el hueso trabecular. Por tanto, existe un potencial de interacciones directas entre los osteocitos y los osteoblastos, entre los osteocitos y otras células óseas (como células de revestimiento y osteoclastos) y entre los osteocitos y el estroma medular. Los osteocitos también contactan con los vasos sanguíneos dentro de la médula y con capilares derivados de los canales de Havers en el hueso cortical. De este modo la expresión de los osteocitos coordina a todos los niveles el proceso de remodelado óseo [11].

Los osteocitos también expresan moléculas que afectan a la formación del hueso, incluyendo la proteína 1 relacionada con Dickkopf (Dkk1), que también se expresa en osteoblastos, y la esclerostina (Sost), que se expresa en osteocitos pero no en osteoblastos. La expresión de Dkk1 y Sost regulan la generación de osteoblastos, ya que promueven la síntesis de antagonistas de BMP y de la activación de la vía de señalización Wnt [12]. Las vías de señalización Wnt son un grupo de vías de transducción de señales formadas por proteínas que transfieren las señales del exterior de una célula hasta su interior (a través de la superficie receptora de dicha célula), regulando la expresión génica [13]. Tanto BMP como Wnt son críticos para la generación de osteoblastos, ya que inducen la diferenciación de progenitores mesenquimales hacia el linaje osteoblástico. Así pues, ciertas moléculas derivadas de los osteocitos modulan tanto el proceso de formación de hueso como su resorción, ya que, mediante la expresión de estos antagonistas, los osteocitos tienen el potencial para regular la formación y actividad de los osteoblastos.

Otra vía de regulación de la resorción ósea es la vía de la apoptosis de los osteocitos, que regula el reclutamiento de los precursores osteoclasticos y su diferenciación por dos vías: (1) directamente debido a que la apoptosis de los

osteocitos induce que las células del estroma y los osteoblastos secreten RANKL que activa la osteoclastogénesis o, (2) indirectamente porque los osteocitos también son capaces de secretar RANKL. No se conoce todavía exactamente cómo RANKL está involucrada en la inducción de resorción ósea por los osteocitos, lo que se sabe es que inicia el desarrollo de los osteoclastos. La apoptosis de los osteocitos se produce en huesos que no están sometidos a carga o en los que están sometidos a un exceso de carga, en ambos casos la apoptosis de los osteocitos precede a la resorción ósea por parte de los osteoclastos. Este hecho lleva a pensar que la muerte de los osteocitos moviliza el reclutamiento de osteoclastos vecinos, aumentando como resultado la resorción ósea local. El rápido descenso de la población de osteocitos en huesos sin carga hace pensar que los osteocitos sean los primeros en responder a los cambios mecánicos [11, 9].

Las células encargadas de la reabsorción son los **osteoclastos**. La reabsorción ósea supone un complejo proceso dependiente de una serie de eventos, los cuales culminan en la degradación de ambas componentes de la matriz; la mineral y la orgánica [14]. Los osteoclastos son células móviles grandes, multinucleadas, ampliamente ramificadas, que presentan un citoplasma acidófilo, son ricas en mitocondrias, y lisosomas con enzimas proteolíticas, se localizan en las superficies óseas trabeculares y el endostio cortical, a menudo en un foso de resorción que ellos mismos han creado [1, 7, 14]. Los osteoclastos proceden de la fusión de células mononucleadas derivadas de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos. La activación de factores tempranos convierte a las células indiferenciadas en progenitores mieloides. Estas células progenitoras están dirigidas hacia el linaje monocito-macrófago. La activación consecuente del receptor RANK identifica esta población de células como precursores típicos de osteoclastos. La exposición a RANKL representa el estímulo primario para la normal formación de osteoclastos y la actividad de reabsorción continua (Figura 5). La habilidad de los osteoclastos para degradar el hueso depende de la formación de un fuerte anclaje a la superficie ósea, después de la cual un cóctel de iones y de enzimas degradadores de la matriz expulsados en la laguna sellada, rompen los componentes orgánicos e inorgánicos del hueso, liberando entonces factores de derivación ósea (incluyendo iones Ca^{2+} y proteínas de la matriz, como el factor de crecimiento de transformación β y osteocalcina) en la cavidad medular [14, 15, 16].

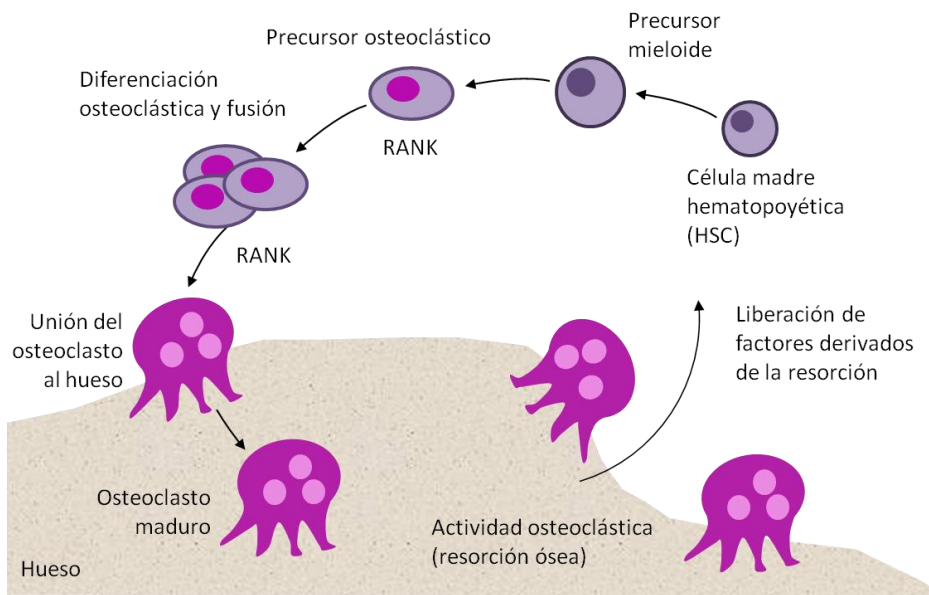


Figura 5. Diferenciación y función de los osteoclastos [14].

Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de proteínas. En una parte de su membrana presentan ondulaciones en forma de cepillo, donde tiene lugar la reabsorción (Figura 6) y una zona de la membrana clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje de la matriz [7].

La función de los osteoclastos, la resorción ósea, supone un complejo proceso dependiente de una serie de eventos, los cuales culminan en la degradación de las componentes mineral y orgánica de la matriz. La primera etapa de la actividad osteoclástica es la identificación eficiente de una región de hueso donde adherirse y la formación de un espacio de resorción. Una vez que un área del hueso queda señalizada para la degradación y remoción, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber. Seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada por su membrana en cepillo, sellando los bordes del área mediante integrinas (principalmente la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ del osteoclasto que reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) existente en el colágeno y otras proteínas de la matriz). Mediante la secreción de iones H^+ y Cl^- , mediada por la anhidrasa carbónica 2, se acidifica el pH. La degradación del mineral inorgánico debido a la acidificación del pH, conjuntamente con la activación de los enzimas proteolíticos degradadores de la matriz (por ejemplo la catepsina K, como se muestra en la Figura 6), liberados a través de vesículas fusionadas al borde en cepillo de la membrana, originan la reabsorción del hueso

mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después, dando lugar a la típica laguna de resorción osteoclástica [7, 14] .

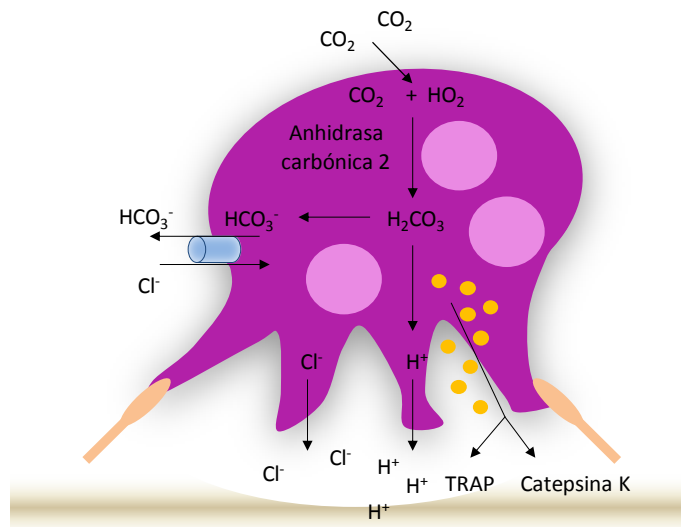


Figura 6. Actividad osteoclástica [14].

La comunicación entre los osteoclastos y las demás células óseas se realiza de forma indirecta, mediante intermediarios químicos, factores paracrinos y factores de unión de la matriz [1]. Actualmente se sabe que los osteoblastos son indispensables para la osteoclastogénesis, ya que el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), producido por los osteoblastos, es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas [7].

Matriz orgánica

La matriz orgánica u osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90 %), sobre todo tipo I (COL I) y tipo V (COL V), aunque también se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III (COL III), relacionado con las fibras de Sharpey y el colágeno tipo XII (COL XII), formado bajo estrés mecánico. Las fibras colágenas de la matriz se disponen siguiendo las líneas de fuerza tensional, por ello el hueso es muy resistente a la tracción. En la molécula de colágeno se encuentra la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de la superficie de las células óseas. Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas características. Sin embargo, el colágeno no tiene afinidad por el calcio, por lo que son otras proteínas las implicadas en el depósito mineral.

Entre las proteínas no colágenas que forman la matriz extracelular (MEC), encontramos los proteoglicanos, moléculas de gran tamaño que constituyen el 10 % de las proteínas no colágenas, las proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico, las glicoproteínas, las proteínas procedentes del plasma y los factores de crecimiento. La osteocalcina (OCN) es una pequeña proteína con ácido γ -carboxi-glutámico, sintetizada por los osteoblastos y las plaquetas. Sus niveles plasmáticos son considerados como un marcador bioquímico de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de osteoblastos [17]. La proteína Gla (*matrix Gla protein*, MGP), es otra proteína con ácido γ -carboxi-glutámico, está presente en la fase previa a la maduración y se asocia a la regulación de la homeostasis del calcio. Las glicoproteínas de la matriz extracelular son la osteonectina (ON), la ALP y las proteínas con el tripéptido RGD. La ON es una glicoproteína con afinidad por el COL I, por el calcio y por la hidroxapatita. Representa el 25 % de las proteínas no colágenas y se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células. La ON en el hueso es necesaria para la mineralización normal. La ALP es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. Está considerada un buen marcador de la actividad osteoblástica. Las proteínas con el péptido RGD, son fundamentalmente cinco: osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP), fibronectina (FN), trombospondina (TSP) y vitronectina (VTN). Estas proteínas son fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos en los que su secuencia RGD es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y los osteoclastos ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$, entre otras), actuando como receptores de superficie de las células óseas, permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales. Las proteínas procedentes del plasma se encuentran en la matriz orgánica en mayor proporción que en el plasma. Son la albúmina (ALB) y la $\alpha\text{2-SH}$ -glicoproteína, relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide. Los factores de crecimiento son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas, etc.), que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina [7, 18].

Fase mineral

El componente mineral del hueso representa el 65 % del peso óseo. Está formado principalmente por calcio, fosfato y carbonato (en proporción 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ y, en menor proporción existe magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor [17]. Los cristales de apatita ósea son más pequeños que los de otros tejidos calcificados, como el esmalte y la dentina. Se disponen en íntima relación con las fibrillas de colágeno, con su eje longitudinal

paralelo a dichas fibras [18]. El plasma se encuentra sobresaturado de calcio y fósforo, por lo que debe haber sustancias que inhiban la mineralización, de hecho la deposición y el crecimiento de cristales de hidroxapatita están estrictamente regulados por las proteínas del plasma [19]. Las proteínas de adhesión favorecen la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben [7].

1.3. Remodelado óseo

El remodelado óseo es un proceso por el cual el tejido óseo está en continuo recambio, proporcionando un mecanismo de adaptación a las condiciones del medio, de reparación de daños y de control endocrino del calcio y fósforo circulante. Tiene lugar mediante la actividad de resorción de los osteoclastos junto con la actividad secretora de los osteoblastos (Figura 7). Estas dos poblaciones son las responsables del constante reemplazo, en cualquier momento, del 3 al 5 % del esqueleto humano. Perturbaciones en esta actividad celular dan como resultado un desequilibrio entre las actividades de ambos tipos celulares, como sucede en muchas enfermedades metabólicas (como en la atrofia por desuso y en la osteopenia inducida en condiciones de microgravedad). El proceso de remodelado óseo en humanos se observa histológicamente tan pronto como comienza la formación ósea en la etapa embrionaria y continúa a lo largo de la vida, aunque la tasa de remodelación disminuye con la edad.

Cuando los osteoclastos resorben hueso, mediante disolución de la matriz inorgánica y la degradación enzimática de los componentes orgánicos previamente descrita, se obtiene como resultado una nueva superficie para la formación de hueso. La membrana en cepillo de los osteoclastos penetra con su superficie invaginada en la matriz ósea hasta una profundidad aproximada de 1 μm . Este rasgo morfológico de la zona intermedia entre la matriz ósea y el osteoclasto es importante porque produce la desmineralización del colágeno de la matriz ósea, presentando una superficie de resorción (laguna) con una topografía tridimensional compleja en escala sub-micrométrica. A esta topografía variable se le suman las hendiduras dejadas por la degradación de los paquetes de fibras de colágeno de la matriz. En el proceso normal de remodelado óseo, la superficie de resorción del viejo hueso proporciona una superficie topográficamente muy compleja, en la cual es depositada una matriz inorgánica, llamada la línea cementante, que proporciona el mecanismo de anclaje entre el nuevo hueso (nueva matriz ósea depositada) y el viejo. Esta línea cementante es una línea continua de matriz no colágena mineralizada inducida por proteínas secretadas por osteoblastos en diferenciación (BSP y OPN). Su existencia se conoce desde las primeras observaciones de von Ebner quien, en 1875, presentó por primera

vez que las osteonas secundarias estaban delimitadas de la matriz ósea circundante por una matriz diferente, que él denominó *kittlinien* (línea cementada en alemán). Más de un siglo después, el interés en esta matriz calcificada ha sido retomado al observar la formación de líneas cementadas tanto en cultivos osteogénicos como en superficies de implantes.

Esta característica morfológica del hueso tiene una importancia crítica en la comprensión de la estructura y composición de la zona de unión del hueso a una superficie. Esto se debe a que la línea cementante se invagina y se entrelaza con la superficie dejada por los osteoclastos, jugando un crítico rol físico en el establecimiento de una zona intermedia entre el nuevo hueso con el antiguo.

La formación ósea de *novo*, durante la remodelación ósea, es un proceso en varias etapas. Primero, los osteoblastos en proceso de diferenciación secretan proteínas no colágenas (BSP y OPN) que son adsorbidas en la superficie del hueso antiguo dejada por los osteoclastos. Serán estas proteínas adsorbidas las que formen la línea cementante induciendo la formación de cristales de Ca y P, que crecen hasta formar una línea continua mineralizada de 0,5 mm de espesor. Finalmente, sobre la línea cementante, los osteoblastos diferenciados depositan la matriz de colágeno cuyas fibras quedarán incrustadas, así los osteoblastos que queden rodeados por la matriz se diferenciarán a osteocitos que mineralizarán la matriz colágena, formando el nuevo hueso (Figura 7) [2, 20].

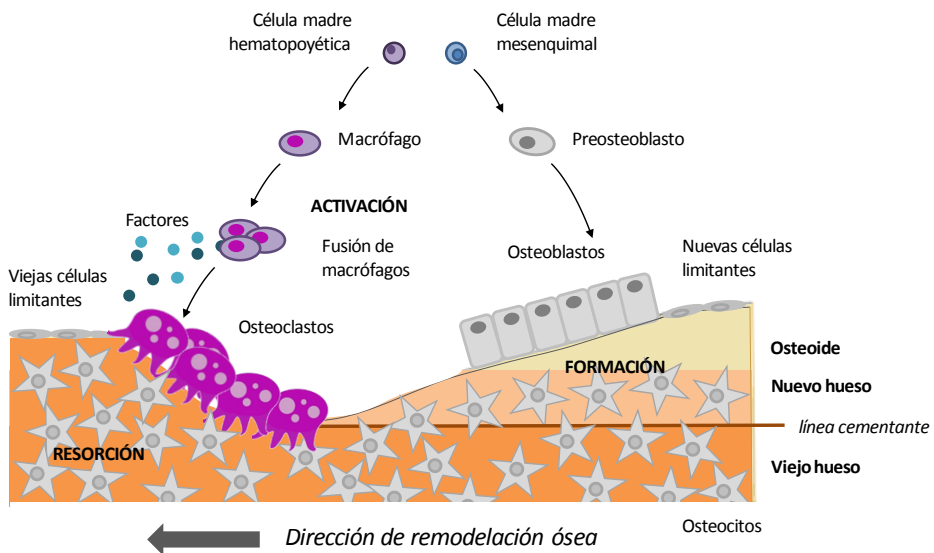


Figura 7. Esquema del proceso de remodelado óseo. Los precursores de osteoclastos son activados para su diferenciación, se forma un frente de avance de reabsorción ósea compuesto por osteoclastos activos. El valle producido por la resorción ósea osteoclastica se reviste,

previamente a la formación del osteoide por parte de los osteoblastos, con células mononucleares (no se muestran) [inspirado en 5].

1.4. Regeneración ósea

El hueso es el único tejido del organismo, a excepción del tejido embrionario, que se restituye totalmente tras una lesión. El resto de tejidos se reparan mediante la formación de un tejido cicatricial, con características diferentes al original. La regeneración ósea es la respuesta que consigue la *restitutio ad integrum* del tejido óseo tras un trauma y que involucra a los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular.

El proceso de reparación de una fractura ósea transcurre con una respuesta inflamatoria inmediata tras el trauma, con un hematoma inicial, con hematíes, plaquetas y fibrina. Las células del coágulo liberan interleuquinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales. Estas señales moleculares promueven la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido fibrovascular, que reemplazará al coágulo inicial. Todo ello está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. En este proceso será fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización [7, 21].

Fase de inflamación

El traumatismo lesiona de forma global al tejido óseo, afectando a células, vasos sanguíneos, periostio y matriz extracelular, además de comprometer los tejidos adyacentes como los músculos, es por ello que se forma un hematoma de fractura que es la base del proceso de reparación.

El tejido vascular dañado interrumpe el aporte sanguíneo a los osteocitos, provocando la necrosis a los lados de la lesión. Los mediadores de la inflamación, liberados por las plaquetas y demás células lesionadas, provocan vasodilatación y la aparición de un exudado plasmático que lleva al edema agudo. Entre las células inflamatorias que migran al foco de fractura se encuentran leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos.

Fase de reparación

El hematoma proporciona un soporte de fibrina que facilita la migración celular, proliferación y síntesis de matriz ósea. La falta de irrigación hace que se acidifique el pH del medio, pero poco a poco el pH se va alcalinizando progresivamente. Los

osteoclastos resorben el tejido necrótico producido en la fase anterior, permitiendo la formación de nuevos brotes vasculares que restablecen la irrigación. En este estadio la fosfatasa alcalina (ALP) alcanza su nivel de actividad máximo, favoreciendo el inicio de la mineralización del callo óseo.

La composición del callo óseo se modifica a medida que progresa la consolidación, de tal forma que las células mesenquimales pluripotenciales del foco de fractura van sustituyendo el coágulo de fibrina por una matriz fibrosa rica en COL I y COL III, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Esta matriz fibrosa se transforma en fibrocartílago, rico en COL II, proteoglicanos específicos y proteínas de unión. El fibrocartílago se mineraliza en paralelo a un aumento de la concentración de COL I, ALP y proteínas no colágenas. El proceso de reparación concluye con la osificación de la masa fusiforme del callo que envuelve los extremos de la fractura y que contiene cantidades crecientes de hueso inmaduro.

A medida que disminuye la reacción inflamatoria, el tejido necrótico y el exudado plasmático son reabsorbidos y los osteoblastos se encargan de producir una nueva matriz ósea.

Fase de remodelación

El hueso inmaduro del callo óseo es sustituido por hueso laminar y la remodelación continúa con la reabsorción de las trabéculas mal orientadas por parte de los osteoclastos y su sustitución por otras nuevas, adaptadas a las líneas de fuerza, para recuperar las propiedades mecánicas originales del hueso comprometido [1, 21, 22].

1.5. Biología del diente

En los mamíferos, los procesos maxilar y mandibular derivan del primer arco branquial [23]. Por la superficie externa del embrión, el primer arco da origen a dos salientes, el proceso mandibular, más voluminoso, que contiene el cartílago de Meckel, y el proceso maxilar, más pequeño. Ambos procesos contribuyen a la formación del maxilar inferior y superior respectivamente [18].

La raíz del diente se inserta en una cavidad del hueso maxilar denominado alveolo dentario, formado por hueso del proceso alveolar. El proceso alveolar está formado por el propio hueso alveolar y por el hueso alveolar de soporte. El hueso alveolar es el revestimiento de la cavidad del diente o alveolo y está compuesto por una fina capa de hueso compacto donde se insertan las fibras periodontales (también llamado *lamina dura*). El hueso alveolar de soporte está compuesto por una lámina de

hueso cortical y por hueso trabecular. La lámina cortical se extiende desde la superficie facial a la lingual del proceso alveolar. El hueso cortical del hueso alveolar de soporte se encuentra situado rellenando el espacio entre las dos corticales, esto es, la del propio hueso alveolar y la del hueso alveolar de soporte (Figura 8). La lámina de hueso cortical del propio alveolo es una estructura odontodependiente, es decir se forma con el diente y se pierde con él junto con los ligamentos periodontales que lo sostienen [18, 24].

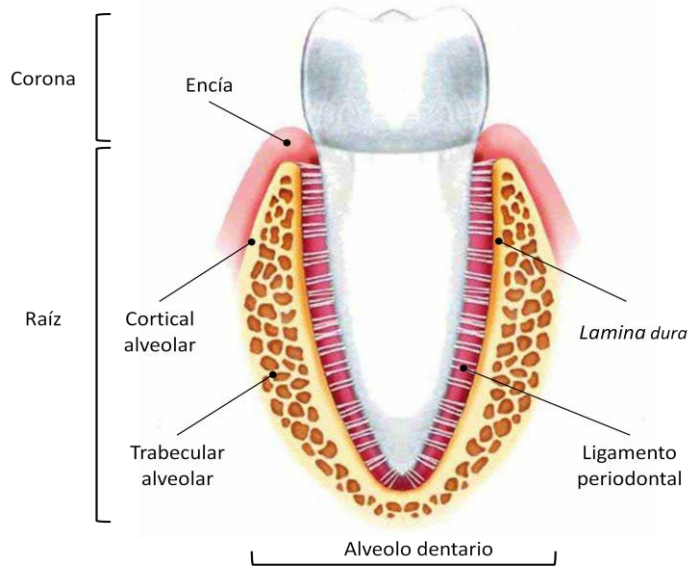


Figura 8. Esquema de la sujeción del diente al alveolo periodontal mediante las fibras periodontales.

Tras la pérdida de un diente, las maxilas (especialmente la inferior o mandíbula) muestran una extensa pérdida de hueso. Es una pérdida acelerada inicialmente debida a una ausencia de carga mecánica, mediada por la apoptosis de los osteocitos (mecanotransductores), seguida de la causada por la fase de remodelado óseo. Inmediatamente después de la pérdida del diente, la cavidad ósea que ocupaba se rellena con un coágulo sanguíneo, las células osteoprogenitoras se diferencian a osteoblastos y comienzan a formar hueso, a la vez que se produce resorción mediada por descarga, consiguiéndose finalmente rellenar el hueco alveolar. Tras esta fase de regeneración continúa la fase de remodelado, en la que la cortical se reduce en espesor debido a la resorción perióstica de los osteoclastos, que aunque se acompaña de aposición endóstica de nuevo hueso, nunca conseguirá desarrollar una capa cortical completa. Además, el remodelado interno provoca una pérdida de organización y una fina trabecular. Tras los primeros 6 meses se habrá alcanzado una pérdida aproximada del 40 % de altura y de 60 % de anchura alveolar [24, 25, 26, 27].

El edentulismo parcial, como resultado de caries, trauma, lesiones endodónticas, defectos del desarrollo o periodontitis avanzadas, crea como consecuencia cambios maxilares que afectan, no sólo al entorno del diente perdido, sino también al conjunto bucodental [28, 29]. Las pérdidas de piezas dentales producen pérdida de la eficacia masticatoria y descarga del diente opuesto, por lo que no sólo se producirá la pérdida del proceso alveolar residual del diente perdido sino también el remodelado alveolar del diente opuesto. Además, se producen desplazamientos dentarios que provocan migraciones, inclinaciones y extrusiones que afectan directamente a los dientes adyacentes y, en general, a todo el aparato bucal debido a la modificación de la línea de mordida, que podría producir alteraciones en el plano oclusal o incluso la aparición de hábitos parafuncionales como el bruxismo [25, 30, 31]. Por todo ello, es importante considerar el reemplazo de una pieza dental perdida mediante un implante que evite la aparición muchas de estas consecuencias, además de cumplir una función estética y social. Por ello es importante considerar una preservación del proceso alveolar post-extracción que ofrezca un buen escenario óseo que no presente un impedimento en la colocación ideal de un implante [26, 27].

2. Implantología oral

El reemplazo de dientes perdidos con prótesis implantables es hoy en día un tratamiento ampliamente aceptado en odontología para la rehabilitación de pacientes con edentulismo completo o parcial. Este descubrimiento en la rehabilitación oral se basa en el concepto de **osteointegración** descrito, por primera vez hace más de 30 años, por los grupos de investigación de Brånemark y el de Schroeder. Ambos grupos describieron este fenómeno biológico como “deposición directa de hueso sobre la superficie de un implante de titanio” [32]. Fue a partir de entonces cuando la implantología experimentó un cambio sustancial, apareciendo infinidad de modelos, materiales y tratamientos superficiales [6], no obstante el titanio puro comercial (CP) se ha convertido en el material de elección en implantología oral y ortopédica por sus excelentes propiedades biológicas y biomecánicas [33, 34].

2.1. Titanio

La necesidad de la prótesis dental surge como respuesta lógica a la pérdida de los dientes. Las sollicitaciones mecánicas específicas hacen necesario el uso de metales para los sustitutos radicales de dichas prótesis. Existen cuatro categorías de metales implantables; aceros inoxidables, aleaciones basadas en cobalto, metales de titanio (puro y aleaciones) y miscelánea (tántalo, oro, amalgamas dentales y otros metales

“especializados”) [35]. Sin embargo, el metal más utilizado hoy en día en implantología oral es el titanio (Ti), tanto en su versión de titanio Comercial Puro (CP), de grados de pureza de 1 a 4, como su aleación Ti6Al4V (compuesta por un 6 % de aluminio, un 4 % de vanadio, hasta un 0,25 % máximo de hierro, hasta un 0,2 % máximo de oxígeno, y el resto titanio). El titanio presenta todas las características de un excelente biomaterial para implantación en hueso; tiene excelentes cualidades mecánicas y de durabilidad, un módulo elástico similar al hueso, una alta resistencia a la corrosión y constituye con el hueso un sistema biocompatible [36, 37, 38, 39].

1. Composición: La pureza del titanio CP es del 98,9 – 99,6 %. Los cuatro grados de titanio CP están disponibles con una microestructura estable en fase alfa. La principal diferencia entre ellos es el contenido relativo de oxígeno. La tensión del límite elástico y el módulo de elasticidad del titanio CP aumentan conforme aumenta el contenido de oxígeno desde el grado 1 a superiores en el grado 4. Pequeñas cantidades de Ni y C tienden a estabilizar la fase alfa de la estructura. La cantidad de contenido de TiFe puede influir significativamente a la resistencia a la corrosión, es por esto que solamente está permitido un porcentaje máximo de entre el 0,10 % hasta el 0,50 % dependiendo del grado de titanio CP [40].

2. Densidad y módulo elástico: Dos propiedades físicas importantes para el uso del titanio como implantes médicos son la densidad y el módulo de elástico. La densidad del titanio CP es muy baja, del 4,5 g/cm³ [40], esto representa una densidad del 57 % de la densidad del acero inoxidable 316L y cerca del 53 % de la del Co28Cr6Mo. La baja densidad del titanio permite una reducción de cerca del 50 % en el peso al comparar implantes de similares dimensiones con implantes de los otros materiales. La reducción en el peso representa un factor positivo para la comodidad del paciente sobre todo cuando se trata de implantes de gran tamaño [41].

El módulo elástico o modulo de Young es una propiedad física que describe la tensión por unidad de deformación en una región elástica, un material con un alto módulo elástico transferirá menos tensión al hueso. Esto produce una condición denominada *stress shielding* (efecto de protección frente a tensiones) que no es deseable ya que la ausencia de carga en el hueso, necesaria para el proceso natural de remodelado, provoca resorción ósea y aflojamiento del implante. El módulo de elasticidad del Ti en de un 55 – 56 % respecto al del acero inoxidable 316L y de un 42 – 43 % respecto al del Co28Cr6Mo [41].

3. Resistente a la corrosión y biocompatible: El titanio es un metal altamente reactivo pero que, en contacto con distintos medios, forma una capa superficial de óxido (TiO_2) químicamente muy estable, de aproximadamente 4 nm de espesor, que

lo convierte en un metal prácticamente inerte, muy resistente a la corrosión y capaz de constituir con el hueso un sistema biocompatible [38, 42, 43]. Es decir, que tiene la habilidad para llevar a cabo su función en una aplicación específica, consiguiendo una respuesta apropiada del sistema biológico huésped [36], [44]. Su superficie es capaz adsorber, de inmediato, proteínas de los fluidos biológicos, como albúmina, laminina, glicosaminoglicanos, colagenasa, fibronectina, proteínas del complemento y fibrinógeno, entre otras, ofreciendo un soporte donde las células pueden crecer y diferenciarse [38].

4. Osteointegración: El fenómeno de osteointegración está relacionado con las propiedades superficiales del implante, siendo las más importantes la composición química, hidrofilia y rugosidad [45]. Se puede modificar la superficie de un implante mediante métodos que modifiquen su propia topografía [38], se pueden crear texturas, marcas, poros, etc. para crear distintos tipos de rugosidad: macro-, micro- y nano-. El nivel macro se define para topografías que están en una escala milimétrica y su papel en la unión al hueso es absolutamente mecánico. Son las rugosidades a nivel micrométrico y nanométrico las que comienzan a tener un papel importante en la unión al hueso, bien sea porque con ellas se logra un anclaje mecánico fino del implante con el hueso o porque influyen en la adsorción de proteínas, la adhesión de osteoblastos y, por tanto, en el proceso de osteointegración del implante [45]. Estas modificaciones se pueden conseguir mediante distintos métodos; deposición de titanio por plasma *spray*, anodización, granallado, arenado y tratamientos ácidos, sinterizado de poros, oxidación, recubrimiento con hidroxiapatita, anodización catódica (*sputtering*), deposición por láser o tratamiento con fluoruro, así como la combinación de algunos de estos tratamientos entre sí, que logran topografías que mejoran la unión al hueso, si bien son muy poco reproducibles [46].

Pese a todas sus magníficas cualidades como biomaterial, el titanio, al igual que todos los metales, tiene una capacidad de osteoinducción baja debido a que es inerte [39]. Se estima que el tiempo requerido para la integración de un implante dental de titanio en humanos es de alrededor de 3 a 4 meses, para Albrektsson [47], o incluso de 4 a 6 meses, para Clark [48]. Sería deseable poder acelerar el proceso de regeneración ósea en el uso de implantes dentales y recuperación de las funciones dentales. Además, existen ciertos factores que aumentan mucho el riesgo de fallo de un implante, tales como la diabetes, la osteoporosis, el tabaquismo, el *bypass* gástrico y los fármacos retrovirales [49], razón por la que el desarrollo de nuevos implantes con capacidad osteogénica es necesaria. Aquí entra en juego el papel de las modificaciones químicas de la superficie del titanio para hacerlo osteoinductivo, es decir para que las células mesenquimales pluripotenciales se vean inducidas mediante señales químicas a

diferenciarse hacia el linaje osteoblástico, que formará nuevo hueso [2, 50]. Para ello, el titanio se puede recubrir con cerámicas y vidrios bioactivos, también se le pueden realizar tratamientos de silanos o inmovilizar péptidos y antibióticos en su superficie [38].

2.2. Osteointegración de implantes dentales

En la Conferencia de Toronto sobre osteointegración celebrada en 1982, se asentó el concepto de osteointegración definido por Albrektsson, seguidor de Brånemark, como la “conexión directa estructural y funcional entre el hueso vivo, ordenado, y la superficie de un implante sometido a carga funcional”. Otro concepto, introducido contemporáneamente por Weiss, y aceptado por la Academia Americana de Implantes, fue el de osteofibrointegración, definido como “la interposición de fibras de colágeno densas en estado de salud, entre el hueso y el implante sometido a carga”. Weiss aplicó este concepto a aquellos implantes que no presentaban una osteointegración del 100 % de su superficie, pero que cumplían los criterios de éxito, en lo que pretendió calificar de pseudoligamento periodontal. Otro concepto que aparece referido en la bibliografía es el de biointegración, definida como “la unión directa bioquímica entre el hueso vivo y la superficie del implante demostrable a través de microscopía electrónica” [en la revisión de 6]. Si bien la osteofibrointegración es una de las formas de biointegración, desde el punto de vista estructural-clínico, constituye un fracaso para la rehabilitación protésica implantosoportada, ya que la fibrointegración no cumple con los requisitos mecánicos de soporte [18]; este concepto fue fuertemente rechazado por el grupo de trabajo de Brånemark. Con el tiempo, el conocimiento de los procesos biológicos de la reparación del hueso alrededor de un implante han ido proporcionando nuevos conceptos, como el de osteoinducción, al que Urist en 1965 [50] se refirió como el “proceso que apoya la mitogénesis de las células mesenquimales perivasculares indiferenciadas, dirigiendo la formación de células osteoprogenitoras con capacidad de formar hueso nuevo” o el de osteoconducción, que más tarde en 1980 definió como el “crecimiento de brotes capilares, tejidos perivasculares y células osteoprogenitoras desde el lecho del hospedador receptor hasta la estructura tridimensional del implante” o, que Davies simplificó más tarde en el “reclutamiento y/o migración de población celular potencialmente osteogénica” [2, 51]. El concepto de *bone ingrowth* (de difícil traducción al español) definido en 1973 por Hench [52] como la “habilidad del tejido óseo de unirse a la superficie de un material sintético”, fue restringida más tarde por Kienapfel para referirse a la “formación de hueso dentro de una superficie irregular (porosa) de un implante” [53].

El concepto de biomaterial y biocompatibilidad dio paso a nuevas acepciones de la definición de osteointegración, como la de Mavrogenis de 2009, que tras definir la osteointegración como un “estado clínico que proporciona una estabilidad de la prótesis a largo plazo, sin ser una propiedad biológica de ningún implante ni metal”, añade que ésta “puede ser entendida como una falta de respuesta biológica local o sistémica a la superficie del implante” o como “ausencia de respuesta negativa del tejido” [20].

La comunidad dental estableció, en 1985, cuatro tipos de hueso, clasificados según su macro-arquitectura ósea, es decir según la proporción relativa de hueso cortical y trabecular. De modo que en el hueso de Clase 1 el hueso es predominantemente cortical (como en el caso de la mandíbula anterior), en el hueso de Clase 2 encontramos una gruesa capa de hueso cortical que envuelve un núcleo de hueso trabecular, ya en el hueso de Clase 3 la capa de hueso cortical es mucho más fina, mientras que el hueso de Clase 4 está casi sólo formado por hueso trabecular (como en la maxila posterior) [54].

2.2.1. Proceso de osteointegración de un implante dental

En todo proceso de osteointegración de un implante interviene la respuesta que el organismo tiene frente a un cuerpo extraño, que es el implante. El organismo está preparado para reconocer, reaccionar y defenderse de manera automática e inmediata (aguda) frente a todo material extraño (endógeno o exógeno). Frente a éste, se presenta una reacción celular y tisular denominada “de cuerpo extraño” como forma particular de un proceso de defensa que se denomina inflamación. La función de la inflamación es la de eliminar el agente extraño, diluirlo, fagocitarlo, aislarlo o inmovilizarlo y reparar los tejidos que hubieran sido afectados [55]. La respuesta del huésped al implante es una respuesta natural que tiene lugar para alcanzar la reparación de la lesión [5].

La relativamente lenta generación del hueso cortical alrededor del implante, depende exclusivamente de la remodelación del hueso laminar, mientras que la generación del hueso trabecular alrededor del implante puede involucrar, no sólo la remodelación de las laminillas trabeculares, sino que puede también incluir la rápida formación de nuevas trabéculas a través del reclutamiento de nuevas poblaciones de células osteogénicas en la zona. Estas células osteogénicas, derivan tanto de las superficies trabeculares endóseas como de la médula que rellena los largos poros interconectados presentes entre las trabéculas. Por lo tanto, el hueso trabecular tiene una superficie muy grande contigua al espacio medular, ya que la médula contiene no

sólo células progenitoras mesenquimales que pueden dar lugar a osteoblastos sino también una rica vascularización que proporciona los precursores mononucleares de los osteoclastos (necesarios para la remodelación) y la población endotelial necesaria para la angiogénesis, por ello no es sorprendente que el hueso trabecular se remodele mucho más rápidamente que el hueso cortical [56].

Alrededor de los implantes endóseos, los osteoblastos pueden depositar hueso sobre la antigua superficie ósea o sobre el mismo implante, esta diferencia fue estudiada por Osborn y Newesley [57] quienes describieron los dos fenómenos, osteogénesis a distancia y osteogénesis de contacto, a través de las cuales el hueso puede llegar a entrar en contacto con la superficie del implante. En la osteogénesis a distancia, el nuevo hueso se forma sobre la superficie del antiguo hueso en la zona de peri-implantación. Las superficies óseas proporcionan una población de células osteogénicas que depositan una nueva matriz que se ancla sobre la superficie del implante. En este caso, el nuevo hueso no se forma sobre el implante sino que el implante es circundado por el hueso. La osteogénesis a distancia se da en la remodelación de hueso cortical tras la implantación ya que, debido a la interrupción vascular producida para la colocación del implante, se produce necrosis del hueso cortical a su alrededor, produciéndose una lenta remodelación por invasión de osteoclastos provenientes del espacio medular subyacente. Este tipo de regeneración ha sido descrita explícitamente para explicar el fenómeno de “osteointegración” de implantes metálicos mecanizados [56].

Por otro lado, en el proceso de la osteogénesis de contacto, el nuevo tejido óseo se forma en primer lugar sobre la superficie del implante. Ya que por definición no hay hueso sobre la superficie del implante antes de la implantación, la superficie del implante debe ser colonizada por células óseas antes que la formación de matriz ósea pueda empezar. Esto es lo que también ocurre en los lugares de remodelación donde una superficie de resorción del hueso antiguo es colonizada por células osteogénicas antes de que nuevo hueso pueda depositarse. Lo que tienen en común el remodelado y la osteogénesis de contacto es que el hueso se forma en el sitio apropiado a partir de células osteogénicas en diferenciación. Llamamos a esto formación ósea *de novo*. Un pre-requisito de la formación ósea *de novo* es que las células óseas deben llegar al hueso antiguo o a la superficie del implante antes que la síntesis de la matriz extracelular se inicie. El resultado de la formación ósea *de novo* es que la zona intermedia del contacto hueso-implante está ocupada por la línea cementada. Por lo tanto, en la osteogénesis a distancia el hueso se aproxima a la superficie del implante mientras que en la de contacto, el hueso se deposita sobre la superficie del implante. Ambos mecanismos tienen lugar en cualquier zona de remodelación endósea, sin embargo el

diseño del implante influye en el grado en el que cada una tiene lugar y por lo tanto la estructura y composición de la zona de contacto hueso-implante puede verse afectada. Obviamente, en el hueso de Clase 3 y Clase 4 es de gran importancia optimizar la osteogénesis de contacto a través del diseño de la superficie del implante para garantizar la estabilidad inicial del implante (estabilidad primaria) [60].

En el artículo de Davies de 2013 [58], se muestra un esquema muy didáctico de cómo se produce el proceso de osteogénesis de contacto en la superficie de un implante (Figura 9). Las células osteogénicas indiferenciadas son reclutadas por la superficie del implante (osteoconducción) donde comienzan a diferenciarse y secretan la matriz de la línea cementada. Estas células van diferenciándose, cambiando de forma y sintetizando una capa de colágeno que se convertirá en osteoide. El cambio de forma de las células continua hasta que las células se diferencian completamente en osteoblastos cuboidales. Estas células se encuentran separadas del hueso subyacente por la capa de osteoide. Esta capa osteoide mineraliza, formando una matriz de cemento que sirve como anclaje de las fibras de colágeno del hueso. Así pues, la verdadera interfaz hueso-implante reside en el rango de escala nanométrica (de la matriz cementada), aunque la interfaz funcional se extiende a lo largo de tres rangos de escalas: macrométrica, micrométrica y nanométrica. En la osteogénesis por contacto los osteoblastos están separados de la superficie del implante por la matriz que ellos elaboran. Esto es equivalente a la formación de hueso que se da de manera natural en los lugares de remodelado óseo [58].

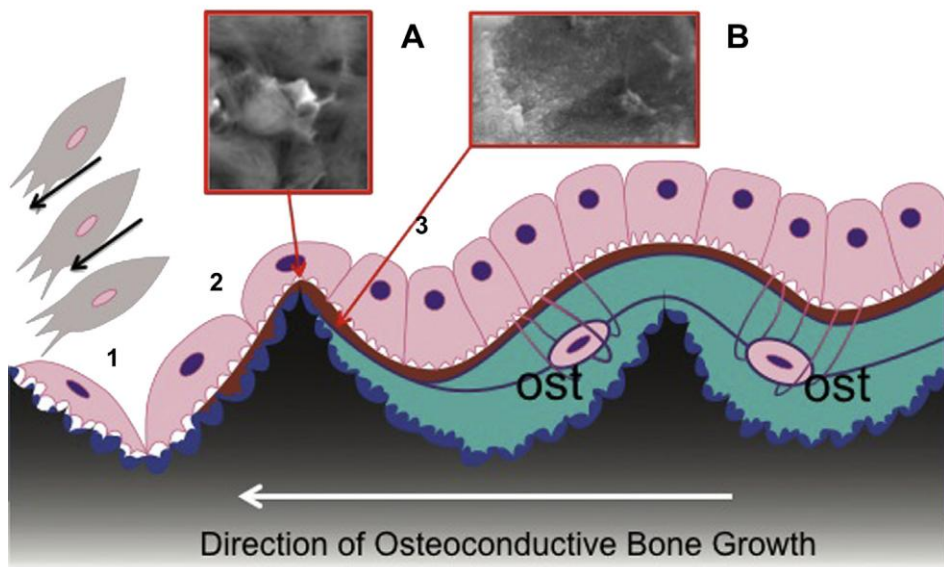


Figura 9. Esquema de la formación de hueso en la superficie de un implante; (flecha) dirección de crecimiento del nuevo hueso por osteoconducción, (células grises) células

indiferenciadas, (células rosas planas) células osteogénicas en diferenciación, (células rosas cuboidales) osteoblastos diferenciados, (rojo) osteoide, (A) fibras de colágeno envolviendo elevaciones de la topografía de la superficie del implante, (B) superficie del implante expuesta por resorción osteoclástica de la matriz [58].

2.3. Factores que determinan el éxito de la implantación

La obtención de una unión estable y duradera del implante al hueso es un requisito fundamental para el éxito del tratamiento. Alcanzar una estabilidad primaria (mecánica) en el momento de la colocación del implante es fundamental para alcanzar la osteointegración del implante [59]. La estabilidad primaria mecánica consiste en una rígida fijación entre el implante y el hueso, sin micro-movimientos del implante o con mínimas deformaciones del hueso. El hueso trabecular no proporciona una base suficientemente estable para la fijación primaria, sólo el hueso cortical proporciona esta estabilidad a primera instancia. Si la fijación del implante al hueso cortical no es suficientemente estable, el implante se moverá dentro del lugar de implantación y, como resultado, se producirán movimientos de tracción y cizalladura que estimularán la formación de una cápsula fibrosa alrededor del implante, dificultándose la osteointegración [20, 60, 61]. Al mismo tiempo, es importante conseguir una fijación secundaria (biológica) que garantice la unión a largo plazo, ésta viene dada por la regeneración ósea alrededor del implante, es decir por la propia osteointegración.

Para Pillar, los factores reconocidos que afectan a la tasa de osteointegración incluyen la topografía del implante, la química de la superficie, una fijación primaria estable y el estado de tensión/deformación de los tejidos que se forman en la zona entre el implante y el hueso, que depende directamente de las cargas aplicadas y del diseño de la superficie del implante [62].

Para el grupo de Kienapfel cuatro son los requerimientos necesarios para que tenga lugar la osteointegración de un implante de Ti: (1) la fisiología de la osteointegración y del *bone ingrowth* (incluyendo la biocompatibilidad del biomaterial respecto a la respuesta celular y de la matriz en la zona de contacto hueso-implante), (2) las características geométricas de la superficie del implante (diseño, topografía, etc.), (3) los micromovimientos del implante y sus métodos de fijación y (4) la distancia entre el hueso y el implante [53].

Seis son los factores que Albrektsson y colaboradores proponen como factores importantes que afectan a la osteointegración del implante: (1) el material del implante, (2) su diseño, (3) las condiciones de la superficie, (4) el estado del hueso, (5) la técnica quirúrgica y (6) las condiciones de carga del implante [63].

Cada autor proporciona su lista de factores que más influencia tienen sobre el éxito de la implantación [46, 53, 62, 63, 64]. De todos estos, los factores que se repiten con mayor frecuencia se han clasificado según su pertenencia al implante (factores que influyen en la estabilidad primaria), al hueso o al paciente (ambos, factores que influyen en que se pueda alcanzar una estabilidad secundaria).

2.3.1. Del implante (o estabilidad primaria)

Para Anil y colaboradores los factores de la superficie del implante que afectan al nivel de osteointegración ocupan una larga lista, entre los que se encuentran: el material, la química y bioquímica de la superficie, su topografía, su hidrofiliidad, su diseño y su carga [46].

Material: la biocompatibilidad se define como la habilidad de un material para llevar a cabo su función en una aplicación específica, consiguiendo una respuesta apropiada del sistema biológico huésped [36, 42, 44, 43]. Más tarde Williams, la redefiniría para adaptarla a los nuevos dispositivos desarrollados en ingeniería de tejidos, determinando que “la biocompatibilidad se refiere a la habilidad de un biomaterial para llevar a cabo su función con respecto a una terapia médica, sin obtener ningún efecto sistémico o local indeseado en el beneficiario de dicha terapia, pero generando la mayor respuesta celular o tisular ventajosa en esa situación específica, y aprovechando el rendimiento clínico relevante de dicha terapia” [65].

Química: respecto a la química de la superficie, Davies y su grupo repiten reiteradamente, en algunos de sus artículos, que la importancia del efecto de la química de la superficie del implante en el éxito de la osteointegración está sobrevalorada y que es la topografía superficial la que juega un papel crucial [58, 2, 56, 56, 66].

Bioquímica de la superficie: referido a la capacidad de adsorción de proteínas de adhesión de la superficie, gracias a las cuales (y mediada por las integrinas) se unirán las células al implante [67]. Desde la identificación de la secuencia RGD como mediadora de la unión celular de proteínas plasmáticas y de la matriz extracelular (incluyendo la vitronectina, el COL I, la OP y la BSP), muchos investigadores han anclado péptidos con la secuencia RGD en la superficie de los biomateriales para promover la adhesión celular. Los receptores celulares de superficie reconocen la secuencia RGD y median la unión [64].

Topografía: la microrugosidad promueve la osteoconducción porque aumenta el área de retención de fibrina en la superficie del implante, favoreciendo la adhesión de plaquetas mediada por integrinas y manteniendo el anclaje celular en su superficie

[56]. Zareidoost, demuestra que superficies de titanio puro con hoyos micrométricos, de entre 0,05 y 0,1 μm , proporcionan un ambiente óptimo para la integración de osteoblastos, induciendo su proliferación y viabilidad [68]. Sin embargo, Gittens demuestra que sus superficies microrugosas de titanio, con picos de entre 60 a 350 μm , ofrecen una superficie que promueve la diferenciación de MSCs en ausencia de medio osteogénico [34]. Puleo y Nanci concluyen que las alteraciones en la morfología y rugosidad de la superficie de implantes han sido empleadas para influenciar en la respuesta celular y tisular frente a éstos. Los recubrimientos porosos han sido desarrollados en base a este razonamiento, ya que la conexión mecánica del hueso regenerado dentro del poro incrementa la fijación y la estabilidad del implante [64]. Kienapfel, tras el estudio de muchos autores, concluye que el rango de tamaño de poro óptimo en la superficie es de 100 a 400 μm [53]. Además, para mejorar la conexión mecánica, superficies con canales (muescas) pueden ofrecer una orientación física a través de la cual la dirección del movimiento celular se ve afectado por la morfología del sustrato [64].

Davies investigó sobre cómo las diferentes escalas topográficas de la superficie del implante afectan a la estabilidad de la interfaz hueso-implante, mostrando los tres escenarios posibles (Figura 10). En el primero (A), describió una superficie lisa modificada para otorgarle rugosidad a escala sub-micrométrica con huecos, en los cuales la matriz ósea se deposita. En este caso, la verdadera interfaz es la profundidad de la combinación de la rugosidad de la superficie del material y la matriz del hueso (línea cementada), coincidiendo la interfaz funcional con la profundidad de la verdadera interfaz. En el segundo escenario (B), mostró una superficie, que como la anterior, seguía el contorno de un hueco de dimensiones micrométricas. En este caso, la interfaz real dentro del hueco es la misma que en la primera situación, pero la profundidad de la interfaz funcional está representada por el volumen de hueso bajo la línea de puntos. En estado natural, podría coincidir con un hueco de resorción producido por osteoclastos. En el último escenario (C), varios huecos, iguales que el hoyo del segundo escenario, se mostraron incluidos en un gran hueco de varias micras de profundidad (escala micrométrica basta). De nuevo aquí, la interfaz real es la misma que en la primera situación, mientras que la interfaz funcional ha aumentado debido al incremento de volumen óseo que se muestra bajo la línea de puntos. La estructura análoga en el hueso podría ser un tramo de resorción creado por uno o más osteoclastos. La modificación de la superficie en el primer caso es menor de 1 μm , mientras que el hueco en el segundo escenario es menor de 10 μm , siendo en el tercero mayor de 10 μm [66].

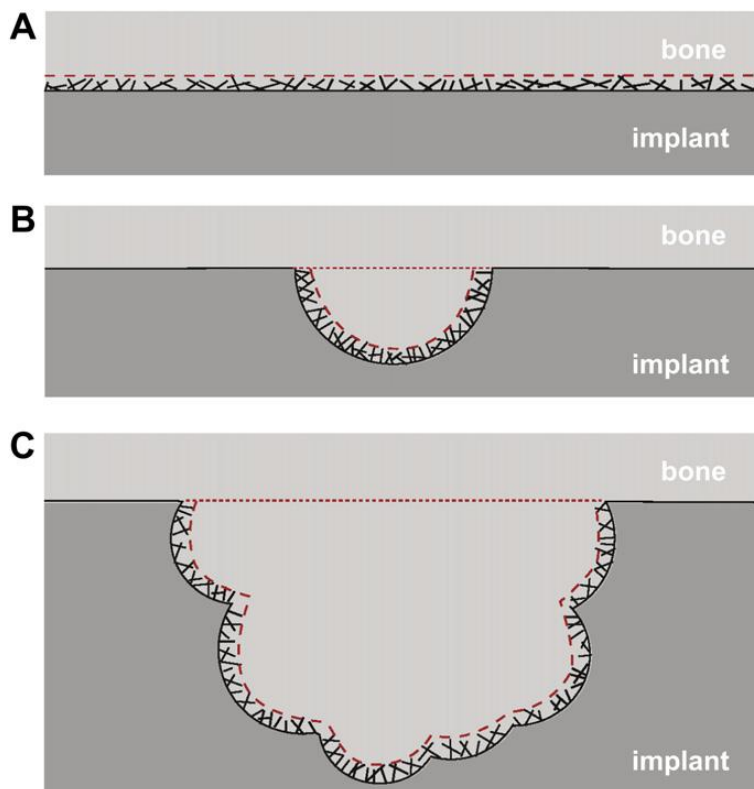


Figura 10. Interfaz hueso-implante; (A) escala sub-micrométrica, (B) escala micrométrica, (C) escala micrométrica basta, (línea discontinua) línea cementada, (línea de puntos) límite de la interfaz funcional [66].

Hidrofilicidad: es la tendencia de una superficie a absorber agua mediante fuerzas adhesivas y cohesivas. Un incremento en la hidrofilicidad de la superficie de un implante induce un mejor contacto entre el hueso y el implante, la diferenciación de osteoblastos, la producción de factores de crecimiento y la expresión osteogénica; aunque los mecanismos moleculares por los cuales el grado de hidrofilicidad afecta a los tejidos no se conozcan [33, 34].

Diseño: la ley de Wolff implica que el cuerpo tiende a optimizar el material óseo en una determinada zona en base a la estimulación mecánica de la misma. Esto significa que, para preservar el *stock* óseo, un implante dental tiene que estar diseñando para poder inducir una estimulación mecánica del hueso adyacente cuando esté sometido a carga, pero sin que se produzcan picos de tensión en el hueso [69].

Hansson propone un diseño con elementos de retención que se extiendan a lo largo de todo el camino, hasta el punto más alto al que llega el hueso marginal, para distribuir la energía de deformación a un mayor volumen de hueso alrededor del

implante y, moderar así las grandes deformaciones puntuales [69]. Sin embargo, la adición de estos elementos de retención también introduciría características estructurales que incrementan el riesgo de retención de placa, y por tanto de peri-implantitis [62].

Carga: en su Ley de la Transformación del Hueso de 1892, Wolff afirma que el hueso es depositado y resorbido de acuerdo con las tensiones que tienen lugar sobre él [70], de modo que se deposita en lugares sometidos a tracción y es resorbido en su ausencia [71]. El hueso responde adaptativamente a la carga, formando hueso cuando se sobrepasa un determinado umbral de deformación dinámica [72].

La carga mecánica es un importante regulador de la actividad celular del hueso. Cuando una carga dinámica es aplicada, los fluidos intersticiales que rodean las células óseas son forzados a salir de las regiones de mayor deformación de compresión, regresando cuando la carga cesa. Este flujo de fluido dinámico oscilante produce una tensión de cizalladura que regula el metabolismo anabólico y catabólico de las células óseas mediante factores de transcripción implicados en la formación de hueso y la resorción para el mantenimiento de la masa ósea [73].

La pérdida de dientes siempre produce resorción del hueso alveolar debido a la ausencia de estimulación mecánica [74]. Por ello, para no prolongar el periodo de descarga en la sustitución mediante implantes dentales se propuso la posibilidad de cargar los implantes tras la implantación. En su revisión, Puleo y Nanci afirman que las superficies cargadas son propicias para la integración tisular de los implantes dentales. Sin embargo, en bibliografía han sido reportados resultados contradictorios al respecto de esta afirmación, observándose que tanto superficies cargadas como no cargadas promueven la formación del tejido óseo [64]. De hecho, existen publicaciones en las que no se encuentran diferencias significativas en varios parámetros (éxito de la implantación, pérdida de hueso marginal, altura de la papila, estética y satisfacción del paciente) entre implantes dentales con carga inmediata, temprana y convencional [75].

Mavrogenis destaca que se ha observado osteointegración con micromovimientos de hasta 30 μm , mientras que movimientos mayores de 150 μm comprometen o inhiben la osteointegración [20]. Sin embargo, según Davies, depende mucho del tipo de hueso y de la zona de implantación, estableciendo un máximo de 90 μm para que se dé la osteointegración [58]. Pero Kienapfel no llega a ninguna conclusión clara tras analizar diecinueve publicaciones [53]. Todo lo contrario que Pilliar, que asume como estandarizado por la comunidad científica un máximo de movimiento de 150 μm [62], a partir del cual se favorece la formación de una capa de

tejido fibroso adherida a la superficie del implante [76]. Szmukler-Moncler estima este umbral en 100 μm [77].

En un estudio experimental con implantes de titanio en maxila de rata, Futami y colaboradores establecieron que, *gaps* hueso-implante que exceden los 500 μm reducen la calidad del nuevo hueso formado y retrasan la tasa de rellenado del *gap* [78]. Kienapfel sin embargo, del análisis de publicaciones con modelos animales de oveja y perro, determina que *gaps* de 3 mm perjudican el crecimiento óseo y que cuanto mayor es el *gap*, menor es el crecimiento de hueso alrededor del implante y menor la fuerza de fijación [53].

2.3.2. Del hueso (estabilidad secundaria)

La calidad, el volumen de hueso, el lugar de implantación y la distancia del implante a los dientes adyacentes influyen en el éxito de la implantación [79]. Por ejemplo, la posición del implante respecto a los dientes vecinos debe ser mayor de 3 mm para evitar un aumento de la resorción del proceso alveolar durante la regeneración [80].

Los huesos de Clase 1 y 4 son los tipos de hueso donde existe más porcentaje de fallo de implantes, puesto que el de Clase 4 (formado en su mayoría por hueso trabecular) sufre de una escasa estabilidad primaria, y sin embargo el de Clase 1, aunque consta de suficiente cortical para proporcionar una estabilidad primaria óptima del implante, no regenerará suficiente hueso trabecular que le proporcione la estabilidad biológica a largo plazo (estabilidad secundaria) [54, 79]. Las fuerzas de masticación en el hueso trabecular actúan de estímulo de la resorción de las superficies trabeculares. Este mismo estímulo es el que actúa sobre las células osteoprogenitoras favoreciendo la remodelación con aposición de nuevo tejido óseo, que aumenta la estabilidad biológica del implante [6].

2.3.3. Del paciente (enfermedades)

El estado de salud de los pacientes es un importante factor que afecta al éxito de la implantación, ya que repercutirá en el estado inicial de los tejidos blandos y del hueso donde se alojará, repercutiendo, por tanto, en la estabilidad del implante. Así como, también repercutirá en la capacidad de regeneración de ese hueso para que se produzca la osteointegración del implante. Las alteraciones del estado de salud de los pacientes que afectan al éxito de la implantación incluyen: periodontitis crónica, deficiencias nutricionales (metabólicas, endocrinas o iatrogénicas) de vitamina D y/o calcio, *diabetes mellitus* y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [49, 81, 82,

83, 84]. Además, la administración de algunos medicamentos como los bifosfonatos (tratamiento para osteoporosis aguda) y corticosteroides (tratamiento inmunosupresor tras un trasplante) o el tratamiento con radioterapia, inhiben la regeneración ósea [49, 85, 86].

Existen estudios que demuestran que el consumo de nicotina aumenta la incidencia de sufrir enfermedades periodontales, inhibe la diferenciación de tejidos y la respuesta angiogénica en los estadios tempranos de la reparación de fracturas, e interfiere con la función osteoblástica y la resorción ósea, reduciendo la expresión de catepsina K y de la metaloproteinasa 9 de la matriz MMP-9 y la organización de actina en los osteoclastos [49, 79, 82, 87, 88, 89, 90].

3. Biovidrios y recubrimientos sol-gel

Los recubrimientos bioactivos son importantes para los implantes periodontales porque el titanio por sí solo es bioinerte. Los recubrimientos bioactivos tienen el potencial de transformarlos en implantes osteoinductores, siendo capaces de estimular la respuesta osteogénica del organismo, potenciando los mecanismos de autoreparación ósea. En 1969 Larry Hench desarrolló el Bioglass® 45S5, el primer material artificial que forma una unión química con el hueso. La bioactividad de los biovidrios reside en que son capaces de unirse rápidamente al hueso gracias a la formación de una capa de apatita hidroxicarbonato (HCA), a la vez que estimulan su crecimiento, más allá de la zona de contacto hueso-implante, gracias a la liberación de sílice (SiO₂) [48, 91].

Los biovidrios pueden obtenerse mediante dos métodos distintos: la ruta tradicional de fusión (*melt-quenching*) y la ruta sol-gel. En el primer método, los óxidos se funden juntos a altas temperaturas (cerca de los 1300 °C) en un crisol de platino y luego, se temple en un molde de grafito (para barras o monolitos) o en agua (para fritas). La ruta sol-gel básicamente forma y ensambla nanopartículas de sílice, a altas temperaturas (sol-gel sinterizado) o bien a temperatura ambiente. Es una ruta de síntesis donde una solución monofásica que contiene varios precursores miscibles, llamada *sol*, se somete a reacciones de polimerización, a altas temperaturas en el caso del sinterizado o a temperatura ambiente, hasta formar un *gel* [91, 92]. El *sol* está formado por una dispersión de partículas coloidales, con un tamaño entre 1 nm y 1 µm, en un fluido. Un *gel* es una red rígida, interconectada mediante poros de dimensiones submicrométricas y cadenas poliméricas, cuya longitud media es mayor

de 1 μm . Esta red se expande a través del medio líquido y se limitará por el tamaño del contenedor [92].

3.1. Proceso sol-gel

Comparado con los procesos convencionales de procesamiento de films, el proceso de síntesis vía sol-gel, ofrece muchas ventajas, ya que permite un mayor control de la composición química del recubrimiento, la preparación de films homogéneos y de elevada pureza, y una reducción en la temperatura de densificación de la cerámica, requiere un menor equipamiento y es potencialmente más barato que ninguna otra técnica alternativa para conseguir un recubrimiento. La baja temperatura de procesamiento ofrece, además, la oportunidad de controlar la microestructura del film (control de la forma y tamaño de poro), facilita la posibilidad de usar precursores funcionalizados y anclar covalentemente otras especies orgánicas y, permite la síntesis de materiales híbridos en los que se polimerizan redes orgánicas interpenetradas con la red inorgánica. Además, con el proceso sol-gel se obtienen recubrimientos bioactivos más finos ($<10 \mu\text{m}$) adheridos a la superficie del titanio químicamente, no mecánicamente [93, 94, 91]. Un gran número de composiciones inorgánicas, basadas en compuestos siloxanos y enlazados con polímeros naturales, han sido desarrolladas usando la técnica sol-gel. Como fuente de silicio, Si-alcóxidos como el trimetil ortosilicato (TMOS), el tetraetil ortosilicato (TEOS), o aquellos que contienen grupos silano, han sido los más comúnmente utilizados [95].

Existe unanimidad científica al determinar que para la síntesis de materiales híbridos el proceso de sol-gel es la técnica más efectiva [96].

Básicamente, el proceso sol-gel se fundamenta en la hidrólisis y condensación de precursores metálicos. El más común es el precursor de silicio, capaz de formar una red inorgánica tipo $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$, con ramificaciones orgánicas dependiendo del resto de la cadena del precursor [92]. Así como los materiales inorgánicos están basados en una red $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$ y no está incluida en su composición componentes orgánicos, los materiales híbridos orgánico-inorgánicos están compuestos por la red inorgánica $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$ y por una red orgánica. Estos materiales híbridos pueden clasificarse en dos tipos, dependiendo de las interacciones entre las cadenas orgánica e inorgánica. Los híbridos de clase I contienen enlaces moleculares, puentes hidrógeno y/o fuerzas de van der Waals, mientras que los de clase II tienen uniones covalentes entre sus componentes [91, 93].

Los alcoxisilanos utilizados en la síntesis de los materiales sol-gel híbridos tienen una estructura tipo $\text{XnSi(OR)}_4 - \text{n}$, donde R es un radical alquil y X una cadena

orgánica que introduce nuevas propiedades a la red inorgánica de los materiales sintetizados, tales como hidrofilia, flexibilidad, respuesta óptica, etc. El grupo orgánico X se puede introducir de dos formas distintas: como un modificador de la red o como un formador de red. Si X es una cadena orgánica no hidrolizable ni reaccionante, la cadena orgánica permanece sin reaccionar ocupando espacio dentro de la red inorgánica, actuando como un modificador de la red inorgánica. Si X puede reaccionar por sí mismo (contiene grupos vinil, epoxi, metacrilatos) o con otros monómeros polimerizables, se formará una red de polímero orgánico en combinación con la red inorgánica, y actuará como formador de red [94]. Las fases de este tipo de síntesis para la obtención de un recubrimiento se describen brevemente en el esquema de la Figura 11.

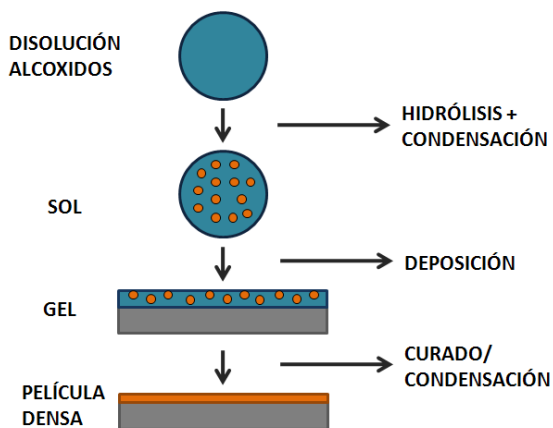


Figura 11. Esquema de la obtención de recubrimientos híbridos orgánico-inorgánico sol-gel [92].

El primer paso en la síntesis, consiste en la obtención del *sol* a partir de la hidrólisis de precursores de silicio mediante la adición de agua, y opcionalmente de un catalizador, produciéndose a su vez las reacciones de condensación. Posteriormente, la fase *sol* se deposita sobre la superficie metálica mediante métodos de inmersión (*dip-coating*), giro a alta velocidad (*spin-coating*) o pulverización, formándose una capa inicial que se denomina *gel* unida a la base metálica por puentes de hidrógeno. La formación de la película densa se produce por la continuación de las reacciones de condensación en la superficie del metal. Este proceso puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o a una temperatura superior. El resultado es la obtención de una película densa o *xerogel* unida químicamente al metal por medio de enlaces covalentes y, por tanto, con una muy buena adherencia. Cuando se sumerge el metal en la disolución de silanos, los grupos silanol ($\text{Si} - \text{OH}$) se absorben en la superficie metálica a través de enlaces tipo puente de hidrógeno. Durante la etapa de

curado/densificación, en la que se suceden las reacciones de condensación, los grupos Si – OH y Me – OH se condensan para formar un enlace fuerte de tipo covalente [92].

3.2. Papel de la sílice en la regeneración ósea

En su artículo de 1986, Carlisle [97] determinó que el silicio (Si) es necesario para la formación del tejido conjuntivo, especialmente para la formación del hueso y el cartílago. Desde entonces, muchos han sido los investigadores que han profundizado acerca del papel del silicio para poder servirse de su bioactividad en la mejora de la osteointegración de prótesis óseas y dentales.

Las propiedades osteoinductoras del biovidrio son debidas a la liberación de compuestos de silicio solubles, ácido ortosilícico $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ en su mayoría [98], como producto de degradación, que estimulan la división celular de los osteoblastos, su diferenciación temprana, la producción de factores de crecimiento y de proteínas de la matriz extracelular [91, 99, 100, 101], así como también promueve el crecimiento de células mesenquimales de médula ósea humana (hBMSC) [102].

El ácido ortosilícico $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ es capaz de activar la producción de COL I en los osteoblastos y promover la diferenciación de los mismos. Mediante inducción del aumento de actividad de la prolil-hidroxilasa se aumenta la síntesis de procolágeno, precursor del COL I, por lo que aumenta la producción de fibras de colágeno. El aumento en la formación de matriz extracelular incrementa la actividad de ALP y OCN, enzimas en cargados de la diferenciación de osteoblastos y mineralización de la matriz [101, 103].

Gao observó, en cultivos de osteoblastos procedentes de osteosarcoma humano (Saos-2), que cambios en el contenido de silicio en vidrios bioactivos, dentro de un rango, desencadenaban selectivamente patrones de expresión de genes de osteoblastos en contacto con el biomaterial; pero que un incremento de silicio fuera de este rango, inducía una desaceleración en la formación de la capa rica en Ca-P, reduciendo la capacidad de *bone-bonding* [104]. Aunque el mecanismo molecular del papel principal del silicio en el metabolismo del hueso permanece sin determinar [105, 106], ensayos *in vitro* han llevado a dilucidar cómo el silicio puede alterar algunas vías de señalización. OPG/RANKL es un sistema crucial de señalización que media y modula la resorción ósea. El silicio es un inductor selectivo de la expresión de OPG, dando como resultado un incremento en la síntesis y liberación de estas citoquinas en el espacio extracelular. Se ha encontrado que el ratio OPG/RANKL aumenta con concentraciones crecientes de silicio, inhibiéndose la osteoclastogénesis en Saos-2 (Figura 12) [105, 107].

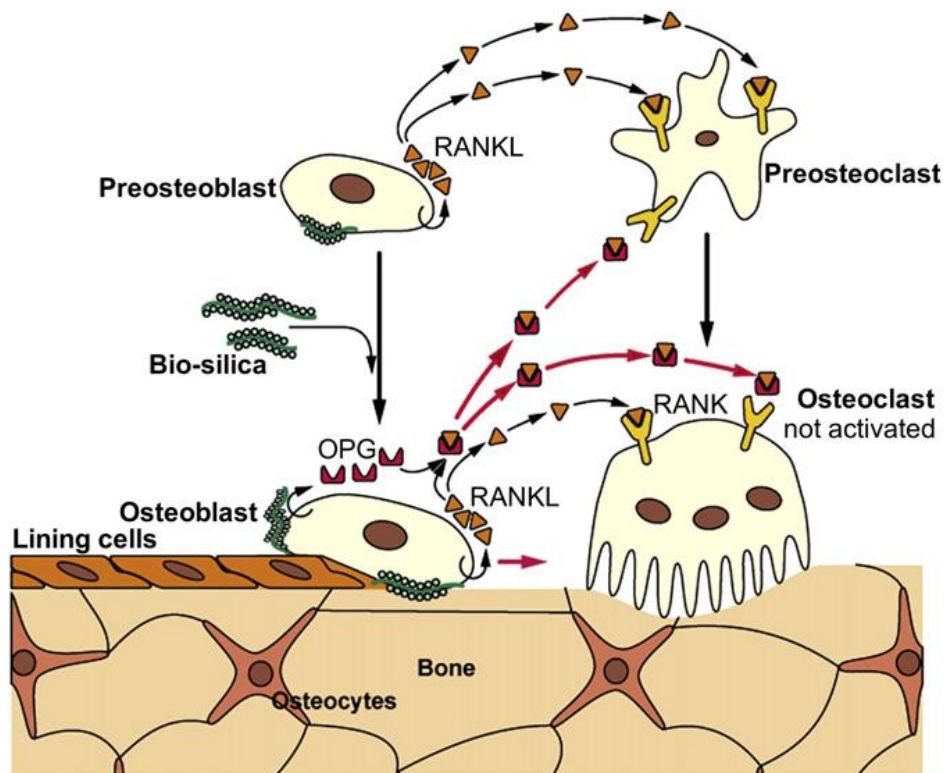


Figura 12. Efecto de la sílice en los osteoblastos, osteoclastos y sus progenitores. El silicio induce la expresión de OPG en los osteoblastos. El aumento del ratio OPG/RANKL inhibe la maduración y activación de los osteoclastos [107].

La síntesis de proteína morfogenética ósea (BMP-2) también se ve inducida por el silicio, ésta activa la ruta de RUNX2/Cbfa1 que regula la expresión de otros genes que son activados durante la diferenciación osteoblástica, incluyendo la OCN, ALP, OPN, Col $\alpha 1$ y Col $\alpha 2$ [105]. Han observado que determinadas concentraciones de iones de silicio mejoran la proliferación, la formación de nódulos de mineralización, la expresión de genes relacionados con el hueso y las vías de señalización WNT y SHH en BMSCs [106]. También observó que los iones de silicio, a una concentración de 4 mM, activan la vía MAPK-ERK en células tipo osteoblastos y, que los iones Ca y Si en revestimientos de Ca_2SiO_4 aumentan la diferenciación celular y la producción de colágeno por la vía TGF mediante la unión de TGF-1 a sus receptores correspondientes [106]. Gao afirma en su artículo de 2001 que cambios en el porcentaje en peso de silicio en los biomateriales producen cambios de comportamiento tanto *in vitro* como *in vivo* [104].

Se ha propuesto que otro prerrequisito de la bioactividad del silicio es la formación de una capa biológicamente activa de apatita hidroxycarbonato (HCA) en la

superficie del implante bajo condiciones fisiológicas (concentración de silicio en suero de 50 µg/dl; [97]). Esta capa intermedia de apatita tiene unas características estructurales y de composición comunes a la apatita ósea [108]. Como resultado de la degradación hidrolítica de los recubrimientos sol-gel en el fluido biológico se obtiene en su superficie ácido ortosilícico $\text{Si}(\text{OH})_4$, que participa en la nucleación de la capa de apatita [98]. Existen cinco estadios propuestos para la formación de HCA, *in vivo* o *in vitro*, en fluido corporal simulado (SBF).

1. Rápido intercambio iónico de Na^+ y/o Ca^+ de la solución por H^+ , creando puentes silanoles ($\text{Si} - \text{OH}$) en la superficie del cristal:

$$\text{Si} - \text{O}^- \text{Na}^+ + \text{H}^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{Si} - \text{OH} + \text{Na}^+ (\text{aq}) + \text{OH}^-$$
 El pH de la solución aumenta y se forma una región rica en sílice cerca de la superficie del vidrio.
2. El aumento local de pH permite atacar a la red del vidrio de sílice por OH^- , rompiendo las uniones $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$. La sílice soluble se pierde en forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$ de la solución, dejando más grupos Si-OH (silanoles) en la interfase vidrio-solución:

$$\text{Si} - \text{O} - \text{Si} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Si} - \text{OH} + \text{OH} - \text{Si}$$
3. Se produce la condensación de grupos Si-OH cerca de la superficie del vidrio: repolimerización de la capa rica en sílice.
4. Migración de grupos Ca^{2+} y PO_4^{3-} de la superficie de la capa rica en sílice y de la solución, formando un film rico en $\text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$ amorfo en la capa rica en sílice.
5. Incorporación de hidroxilos y carbonatos de la solución y cristalización de un film de $\text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$ a apatita hidroxicarbonato (HCA) [109, 110].

Una vez la capa de HCA está formada en la superficie, los siguientes pasos son menos conocidos, pero lo que sí parece evidente es que las proteínas adsorbidas sobre la capa de HCA inducen que las células se adhieran a ella y se diferencien, produciéndose matriz ósea [91].

La bioactividad está directamente relacionada con la energía de activación de la sílice de la solución en el biomaterial. Sin embargo, la conectividad de la red es la clave y depende de su contenido en sílice. La composición del biomaterial es la variable que más influye en la tasa de formación de la capa de HCA y la capacidad de unirse al hueso. Fundamentalmente, un bajo contenido en sílice significa una red menor conectada de sílice, la cual es más propensa a disolverse, y por lo tanto las etapas anteriormente nombradas tienen lugar más rápidamente. Los materiales sintetizados vía sol-gel ofrecen la ventaja de que permanecen bioactivos con más del 90 mol% SiO_2 ,

en contra de lo ocurrido con los biovidrios sintetizados por la ruta tradicional de fusión que, con un 60 mol% de SiO_2 en su composición, no se unen al hueso y pierden su bioactividad [91, 98].

Kokubo y Takadama observaron la formación de apatita, empleando el método de fluido corporal simulado (SBF), sobre la superficie de geles de óxidos metálicos (sintetizados mediante técnica sol-gel) compuestos por SiO_2 , TiO_2 , ZrO_2 , Nb_2O_5 y Ta_2O_5 (Figura 13). Sin embargo, esta capa de apatita no fue observada sobre la superficie de geles compuestos por Al_2O_3 . Estos resultados les indicaron la eficacia de los grupos superficiales Si-OH , Ti-OH , Zr-OH , Nb-OH y Ta-OH para inducir la formación de apatita sobre su superficie en el interior de un organismo vivo [111].

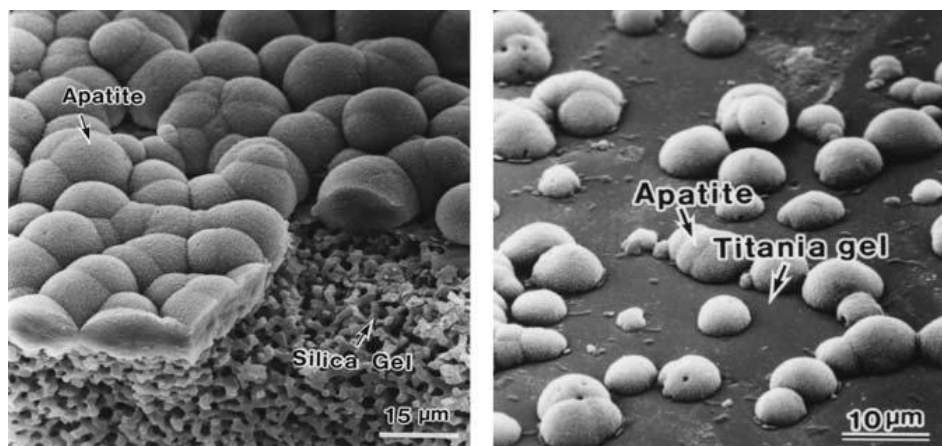


Figura 13. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de la formación de apatita sobre la superficie de un gel de SiO_2 (izquierda) y sobre la superficie de un gel de TiO_2 (derecha) tras la inmersión en fluido corporal simulado (SBF) [111].

Bebido al gran grado de biocompatibilidad de los materiales basados en sílice, existe un gran interés en ellos en el campo de la investigación biomédica [112]. El silicio es el componente principal de estos materiales, que como hemos apuntado anteriormente los hace bioactivos [99, 101, 113, 114].

3.3. Funcionalización de la red sol-gel

Debido a las condiciones suaves de síntesis del proceso sol-gel, es posible incorporar altas concentraciones de muchos tipos de agentes activos biológicamente en la fase líquida de sol. Los agentes son embebidos en la matriz del gel, el cual, tras la condensación y secado se convierte en un sólido vítreo y poroso [115].

La síntesis de los materiales híbridos es compleja y hay muchos cambios químicos que los convierten en materiales con éxito en la regeneración de tejidos [91]. La

principal ventaja de este tipo de recubrimientos se debe a que se consigue un recubrimiento adherido químicamente al implante de titanio a través de fuertes enlaces covalentes entre el recubrimiento y el metal. Este tipo de recubrimientos permiten la inclusión de moléculas biológicas en su matriz e incluso la funcionalización de su red para unir químicamente estas moléculas biológicas a la matriz.

Las biomoléculas embebidas en la red mantienen su conformación, sus propiedades físicas y químicas, y una actividad cercana a la molécula libre, es decir, la matriz sol-gel estabiliza las proteínas embebidas evitando la desnaturalización térmica y química. La porosidad de la matriz puede hacer que las moléculas embebidas en la matriz sean fácilmente accesibles a los reactivos externos y se puedan producir reacciones químicas con la película inorgánica a gran velocidad [92]. De esta forma la liberación es progresiva, pudiendo ser controlada según la velocidad de degradación del sol-gel. Se han inmovilizado proteínas como la gelatina y el colágeno comercial hidrolizado en el recubrimiento sol-gel evitando altas concentraciones de alcohol en el sol.

El precursor glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMS) tiene un anillo epoxi en uno de sus extremos y tres grupos metoxisilanos en el otro extremo de la molécula. Mediante la apertura del anillo el GPTMS puede unir moléculas biológicas a la red sol-gel, funcionalizando su superficie [95].

Inclusión de moléculas biológicas a la red sol-gel: colágeno y gelatina

Estos materiales híbridos han llamado la atención debido a sus prometedoras propiedades y su capacidad para formar un sistema compatible con los tejidos vivos, encontrando aplicación en el campo de los biomateriales como sustitutos óseos, cementos para reparación ósea y reconstrucción, inmovilización de enzimas y células, catálisis y sensores. Para aumentar su eficacia los materiales híbridos sol-gel se han funcionalizado con diversas proteínas relevantes para el tejido óseo como colágeno y gelatina, mezclando los precursores con las proteínas en agua ácida [96].

Uno de los propósitos del uso de materiales híbridos es el de mimetizar la estructura natural del hueso. El COL I es un polímero candidato, ya que forma parte en un 90 % de la componente orgánica del hueso. Posee unas excelentes cualidades mecánicas debido a su conformación de triple hélice. Sus cadenas polipeptídicas están compuestas por aminoácidos que contienen muchos grupos $-NH_2$ y $-COOH$ disponibles para la funcionalización. Sin embargo, esa conformación de triple hélice que le confiere tantas ventajas representa una dificultad a la hora de procesar el colágeno para la síntesis de biomateriales ya que lo hace muy insoluble. Sólo se

disuelve en ácido acético a baja concentración. Una alternativa, como solución a este problema, es la utilización de gelatina, que es colágeno desnaturalizado. La gelatina mantiene los grupos funcionales a lo largo de sus cadenas, siendo soluble en agua [112]. La gelatina está comercialmente disponible como un polímero biodegradable. Es muy utilizada en aplicaciones médicas y farmacéuticas, y su bioseguridad está totalmente probada a lo largo del tiempo que se lleva utilizando en aplicaciones médicas [96, 116].

Sin embargo, la desventaja de utilizar un derivado polipéptido natural como la gelatina, es que las cadenas de amino ácidos no son necesariamente uniformes. Esto dificulta definir exactamente cuántos enlaces covalentes se formarán entre la gelatina y la sílice, así como cuántos grupos funcionales tendrá cada molécula de gelatina. Además, la gelatina degrada muy rápidamente, por ello los silanos son buenos candidatos para ser combinados con ésta porque optimizan la estabilidad de su degradación [112]. Los biohíbridos sílice-gelatina se aplican en la ingeniería de tejido óseo, la biocatálisis y los sistemas de liberación de fármacos [96].

Unión a fibronectina:

La fibronectina y el colágeno son dos componentes esenciales de la matriz extracelular (ECM) y juegan un papel clave en diversos procesos, incluyendo la adhesión, migración y la diferenciación celular. La fibronectina es una gran glicoproteína modular encontrada en la matriz extracelular y en los fluidos corporales de la mayoría de los organismos, formada por tres tipos de módulos conservados y repetitivos (I, II, y III) como se puede ver en la Figura 14. Interacciona con una gran variedad de otras moléculas incluidas las integrinas, la heparina, la fibrina, el colágeno y la gelatina y otras moléculas extracelulares [117]. Los sitios de unión a gelatina de la fibronectina están confinados en una región que tiene 4 módulos tipo I y 2 módulos tipo II, en el siguiente orden; I₆, II₁, II₂, I₇, I₈, I₉. Esta región, llamada región GBD (*Gelatin Binding Domain*, dominio de unión a gelatina), puede ser aislada como un fragmento de 42 kDa que une a la gelatina con una gran afinidad. Los fragmentos fuera de esta región incluyen un fragmento -amino terminal de 29 kDa con módulos de tipo I del 1 al 5 y un fragmento -carboxilo terminal de 19 kDa con módulos tipo I del 10 al 12 que no une gelatina. El fragmento de 42 kDa contiene los únicos módulos de tipo II de toda la fibronectina, módulos que se sabe que juegan un rol en la unión a gelatina, no sólo en la fibronectina si no también en otras proteínas que unen gelatina (especialmente algunas metaloproteasas de matriz donde también se han encontrado módulos de tipo II) [118, 119]. El grupo de Katagiri en 2003 [118] comprobó que los módulos tipo II₂ y I₉

son los más críticos para la unión a gelatina, aunque los 6 módulos contribuyen directa o indirectamente a esta unión.

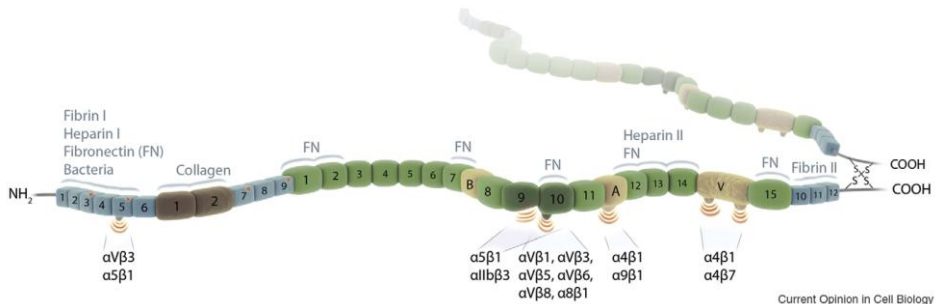


Figura 14. Esquema de la composición de los módulos de la fibronectina del plasma humano; de tipo I (azul), de tipo II (marrón) y tipo III (verde) y sus regiones de unión a fibrina, heparina, fibronectina y colágeno [120].

Pero la fibronectina, como se ha señalado anteriormente, no sólo se une a la gelatina, posee otro dominio de unión a integrinas, formado por receptores transmembrana de adhesión celular mediante los cuales el citoesqueleto de actina celular se une a la capa de fibronectina (y otras proteínas de la ECM como vitronectina, fibrinógeno, colágenos y lamininas) adsorbida en la superficie del biomaterial [121]. La adhesión mediada por integrinas es un proceso complejo que implica la asociación de la integrina con el citoesqueleto de actina de la célula y un agrupamiento de complejos supramoleculares que contiene proteínas estructurales (vinculina, talina, tensina, etc.) y moléculas de señalización [122].

El receptor $\alpha_5\beta_1$ de integrina es el primero en unirse a la fibronectina, mediante la secuencia RGD en el dominio III₁₀ y el sitio sinérgico en III₉ [117, 123] (Figura 15). Otras integrinas también se unen al motivo RGD, incluyendo todos los miembros de la subfamilia α_v , $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$ y la integrina específica de plaquetas $\alpha_{11b}\beta_3$. De todas las integrinas de unión a fibronectina, $\alpha_5\beta_1$ está considerada como la de mayor importancia en la elaboración de la red de fibronectina [120] y tanto el lugar de unión a RGD como el sitio sinérgico de unión son necesarios para iniciar la formación de fibrillas [117].

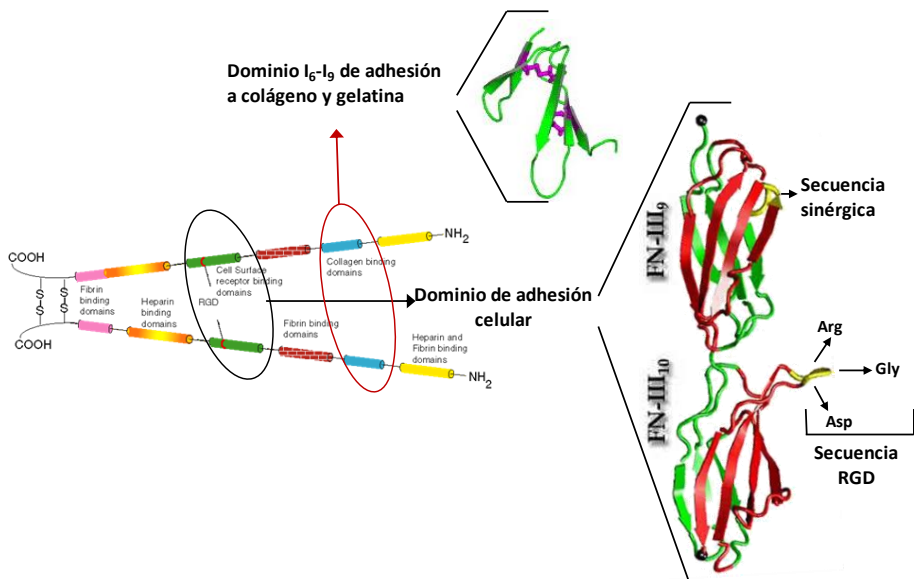


Figura 15. Estructura de los dominios de unión de colágeno-gelatina e integrina (adaptado de <https://beyondthedish.wordpress.com/tag/fibronectin/> y [123]).

Por todo ello, la funcionalización con gelatina se emplea en la síntesis de biomateriales como estrategia para aumentar la adhesión celular mediada por integrinas a través de la unión fibronectina-gelatina.

Materiales híbridos sol-gel con gelatina:

El mecanismo de unión de matrices de soporte (*scaffolds*) híbridos TEOS-gelatina de clase II, sintetizados empleando GPTMS, fue confirmado por resonancia magnética nuclear (RMN) de sólidos por el grupo de Ren y Tsuru. Vieron que, conforme la cantidad de uniones covalentes incrementaba, la cantidad de gelatina liberada decrecía. La tasa de liberación de la sílice también descendió y siguió un perfil similar al de liberación de la gelatina. Esto implica que la disolución fue congruente y que degradaba como un solo material, un verdadero híbrido [124].

En los híbridos de GPTMS con gelatina de Ren y colaboradores [125], los iones calcio rompen la disposición helicoidal de las fibras de gelatina y desenroscan las hebras en ovillos al azar. El análisis de sus residuos amino indica que los grupos epoxi de GPTMS preferiblemente se injertan en los residuos de lisina e histidina, mientras que los grupos Si – OH en la molécula de GPTMS (procedentes de la hidrólisis de los grupos Si – OCH₃) están condensados con los de otra molécula para unir dos fibras de gelatina adyacentes.

El entrecruzamiento químico depende de los enlaces con las cadenas de gelatina, vía puentes covalentes, entre el entrecruzador y los grupos amino de la proteína. En este contexto, las especies de silicato pueden ser consideradas como agentes entrecruzadores potencialmente interesantes, debido a que interactúan mediante interacciones electrostáticas y con puentes de hidrógeno con unos pocos poliaminoácidos y proteínas [96].

Mahoney y colaboradores, en 2010, presentaron un nuevo biomaterial basado en un híbrido sílice-gelatina con unas propiedades altamente adaptables, estableciendo que los fuertes enlaces covalentes entre las cadenas orgánicas e inorgánicas son la clave para obtener un verdadero material compuesto que degrade como un único material [114].

Las cantidades que los diversos autores han introducido de gelatina en sus materiales son distintas, no siendo justificadas por ninguno de ellos, y se mueven en un amplio rango que oscila entre el 2 y el 12,5 % en masa. En 2001, Ren y colaboradores sintetizaron híbridos siloxano-gelatina en los que el precursor 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPS) estaba injertado en las cadenas de gelatina en los extremos epoxi, mientras que en el otro extremo las moléculas de GPS injertadas formaban entrecruzamientos mediante hidrólisis y condensación de los grupos -metoxi del silano. En la síntesis de estos híbridos se añadió una solución de gelatina al 12,5 % en masa en HCl 0,1M [124], más tarde a esta misma composición le añadieron nitrato de calcio $[(Ca NO_2)_3]$ para obtener *scaffolds* porosos mediante tratamientos de *post-gelationsoaking* (remojo tras gelificación) y *freeze-drying process* (liofilización) [126]. En 2002, perfecciona esta técnica para obtener *scaffolds* porosos híbridos con Ca^{2+} y gelatina, basados en el precursor GPTMS, manteniendo el mismo porcentaje en masa de gelatina. Un año más tarde, realizó ensayos *in vitro* de citotoxicidad, proliferación y diferenciación con MC3T3-E1 [127], puesto que estos *scaffolds* con micro y macroporosidad fueron diseñados para regeneración ósea [125]. En 2006, mejoran sus *scaffolds* porosos híbridos con Ca^{2+} y gelatina, pero siguen manteniendo el mismo porcentaje en masa de gelatina [128]. Para la síntesis de sus híbridos, Smitha en 2007 [96] utiliza como precursor el metiltrimetoxisilano (MTMS), añadiendo el 2 % en masa de gelatina a 5 g de sílice coloidal en 100 ml de agua bajo constante agitación. Siguiendo los pasos de Ren, Tsuru y colaboradores, en 2008 [129], sintetizaron materiales híbridos mediante técnica sol-gel, añadiendo una cantidad apropiada de GPTMS a una solución de gelatina al 2 % en masa, agitando durante 2 h a 40 °C. Una cantidad apropiada de TEOS fue prehidrolizada con HCl 0,1 N durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de ser añadida a la mezcla de GPTMS con gelatina. La cantidad de silicio liberado y la tasa de liberación fueron controladas por el contenido

de GPTMS y TEOS de los híbridos. Mahoney en 2010, preparó una disolución de gelatina en HCl (10 mM) a una concentración de 50 mg/ml. A ella le añadió una cantidad apropiada de GPTMS y mezcló durante 14 horas antes de añadir el precursor sol-gel TEOS. El sol lo preparó añadiendo por orden: agua destilada, HCl (1 N) y TEOS. El ratio molar agua/TEOS fue de 4 y el HCl se añadió para catalizar la hidrólisis de TEOS en un ratio de volumen (agua/HCl) de 3. La solución se dejó en agitación durante 1 hora antes de añadir la solución de gelatina funcionalizada y se agitó durante 1 hora más [114]. Dashnyam, en 2013, introdujo gelatina en una solución acuosa basada en silicio utilizando la reacción sol-gel para producir *scaffolds* híbridos orgánico-inorgánicos, utilizando GPTMS y trimetilortosilicato (TMOS) como precursores. La gelatina fue disuelta en agua a una concentración del 5 % en masa y después se le añadieron GPTMS y TMOS mientras se agitaba vigorosamente de 1 a 3 horas para preparar los soles híbridos [95].

En relación a las aplicaciones, en bibliografía encontramos numerosos casos en los que se emplea la gelatina como estrategia para aumentar la adhesión celular a la superficie de matrices porosas sintetizadas vía sol-gel para tejido óseo [127, 125], [130, 131], sin embargo en los últimos años es más frecuente su uso en el desarrollo de vehículos de liberación de distintas biomoléculas y fármacos, bien para regeneración de tejidos (entre ellos el tejido óseo) o como tratamiento de enfermedades. En 2006, El Departamento de Biomateriales del Centro de Investigación de Ingeniería Médica de la Universidad de Xiamen (China), a la cual pertenece el Prof. Ren, desarrolló un *scaffolds* híbrido gelatina-siloxano sintetizado por vía sol-gel cargado con gentamicina [132]. Más tarde, en 2008, desarrollaron nanopartículas híbridas gelatina-siloxano sintetizadas por la técnica de sol-gel funcionalizándolas con el péptido Tat (*Trans-Activator of Transcription*, transactivador de la transcripción genética) como vector (derivado del genoma viral del VIH) para transfección de genes [133]. En 2013, se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo* con dichas nanopartículas decoradas con el péptico Tat para transportar el gen de CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*, péptido relacionado con el gen de la calcitonina) que puede atenuar los vasoespasmos cerebrales y mejora los resultados neurológicos en modelo de hemorragia subaracnoidea de rata [134]. Los híbridos de Dashnyam, en 2013, estaban diseñados como vehículos liberadores del factor-1 derivado de estroma celular (*SDF-1, Stromal Derived Factor-1*) para el reclutamiento de células madre osteoprogenitoras [95]. En 2014, Zhang y colaboradores sintetizaron nanopartículas híbridas gelatina-siloxano vía sol-gel como vehículo de liberación de óxido nítrico para regulación celular vascular, realizando ensayos *in vitro* con células humanas de musculatura lisa de aorta

(AoSMC) y con células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC) con éxito [135].

Sin embargo, todos estos materiales enumerados fueron matrices porosas o nanopartículas, ninguno de ellos fue empleado como recubrimiento. Smitha, en 2007, publicó un trabajo sobre recubrimientos sol-gel funcionalizados con gelatina, utilizando TEOS como precursor sol y añadiendo a éste, junto con HCl 0,001 M, distintos porcentajes en peso de gelatina: 1, 2, 4, 6 y 8 % en peso del sol. Se obtuvieron recubrimientos de entre 300 – 500 nm sobre vidrio. Para los recubrimientos con el 2 % de gelatina obtuvieron un sol homogéneo que aumentaba de viscosidad conforme aumentaba su contenido en gelatina, obteniendo para concentraciones mayores del 4 % precipitados en el sol debido a la saturación de gelatina de la solución [96].

Inclusión de fármacos a la red sol-gel

La utilización de recubrimientos orgánico-inorgánicos como vehículos de liberación de fármacos es muy interesante para minimizar el riesgo de infección, ya que siempre existe la posibilidad de infección nosocomial [136, 137] o debida a la exposición del implante a la cavidad bucal (peri-implantitis) [138].

El proceso sol-gel permite introducir el fármaco antes o después de la hidrólisis de los precursores, dando resultados similares en la estructura y dispersión del fármaco, puesto que donde tiene lugar la encapsulación es durante la etapa de curado del recubrimiento [139, 140].

Para incorporar los fármacos en los materiales sol-gel, se adiciona el fármaco disuelto en agua desionizada a la fase sol, bien sea para la síntesis de monolitos [141], xerogeles [142], films [143] o microesferas [115]. Radin y colaboradores [143] observaron en sus estudios que el ratio molar de precursor de sílice respecto al agua (R) es importante para la correcta adición de un fármaco a la reacción sol-gel. Vieron en sus materiales que el ratio molar de TEOS respecto al agua era importante para que, al añadir el fármaco (vancomicina), el sol se mantuviera estable y traslúcido en el tiempo. Por ello, sólo cuando R se incrementó a 5 pudieron adicionar con éxito las concentraciones de vancomicina, de hasta el 20 % en peso, que evaluaron [143].

Así pues, la liberación controlada de antibióticos, proteínas y factores de crecimiento depende, además del ratio molar de precursor de sílice respecto al agua (R), de otros parámetros: el tipo de precursor, la relación entre los silicios y el fármaco, el espesor de la película y su peso y, la concentración y el tamaño molecular del fármaco. Cuanto mayor es la relación silicio/fármaco más lenta es la liberación. A

mayor tamaño del fármaco, más complicada es su difusión a través de la película y así, la cinética de liberación disminuye [115, 139, 144].

En la bibliografía podemos encontrar estudios de diversos autores que trabajan con distintos biomateriales sintetizados vía sol-gel funcionalizados con moléculas de distinta naturaleza para mejorar el proceso de osteointegración, bien sea previendo la infección, reduciendo la inflamación o aumentando la formación de la matriz mineralizada. Así pues, encontramos al grupo de Marycz que funcionaliza con ácido ascórbico (AA) recubrimientos basados en SiO_2 (TEOS) para recubrir implantes de acero 316L y Ti6Al4V que aumentan la proliferación celular en ensayos *in vitro* [145]; Donesz-Sikorska funcionaliza con betametasona recubrimientos de sílice con grupos amino activos [SiO_2 (NH_2)] sobre acero 316L por *dip-coating* [146]. La investigadora Michelina Caturo cuenta con una extensa experiencia en el desarrollo y funcionalización de diversas formulaciones de materiales sol-gel. Comenzó desarrollando materiales sol-gel basados en TMOS ricos en iones Na y Ca funcionalizados con plata, a los que también les añadió PCL [147, 148]. En una nueva etapa centra sus estudios en la funcionalización con ampicilina de diversas composiciones de híbridos basados en TiO_2 , a los que añade SiO_2 , PCL o polietrimida (PEI) e híbridos ZrO_2 con PCL. En todos ellos comprueba la integridad del antibiótico tras la síntesis mediante HPCL y registra que la cinética de liberación tiene lugar en más de un paso [149, 150, 151, 152]. Más tarde, tras funcionalizar microesferas basadas en sílice con ketoprofeno e indometacina, y comprobar que se encuentran embebidas en la red mediante su cinética de liberación, utiliza estos antiinflamatorios para funcionalizar diversas combinaciones de materiales híbridos sol-gel de PCL con SiO_2 y con ZrO_2 [152, 153, 154]. A partir de 2013, comienza a realizar estudios de citocompatibilidad (con distintas líneas celulares: 3T3, Saos-2 y fibroblastos) de distintas combinaciones de materiales bioactivos sol-gel para recubrir implantes de titanio: SiO_2 + ampicilina, SiO_2 + Ca^{2+} + ampicilina, SiO_2 + PCL + ketoprofeno, ZrO_2 + PCL y ZrO_2 + polietilenglicol (PEG), concluyendo que todas ellas funcionan como sistemas de liberación controlada y local de fármacos para aplicación biomédica [155, 156, 157, 149, 158, 159, 160].

4. Evaluación biológica de implantes dentales

4.1. Definición de biocompatibilidad

Schmidt y colaboradores (2001) definen un material ideal para implantes dentales como aquel que tiene: una composición química adecuada para evitar una

reacción tisular adversa, una excelente resistencia a la corrosión en el medio fisiológico, una solidez aceptable, una alta resistencia al desgaste y un módulo elástico similar al del hueso (para minimizar la resorción ósea alrededor del implante) [161], es decir, que constituye con el hueso un sistema biocompatible [162].

La biocompatibilidad es un requerimiento esencial para la aplicación de biomateriales en ingeniería de tejidos [163] y refleja un conjunto de características complejas. En resumen, la biocompatibilidad consiste básicamente en dos elementos: (a) bioseguridad (una adecuada respuesta del huésped sistémica y local, esto incluye la ausencia de citotoxicidad, mutagénesis y/o carcinogénesis) y (b) biofuncionalidad (la habilidad de un material para llevar a cabo determinadas funciones para las cuales se diseñó) [164]. Por tanto la biocompatibilidad puede ser definida como la habilidad de un material para llevar a cabo su función en una aplicación específica, consiguiendo una respuesta apropiada del sistema biológico del huésped [36, 44, 163, 164]. Sin embargo, Williams no está de acuerdo con esta definición, ya que eleva a la biocompatibilidad al grado de concepto, más que tratarla como un descriptor práctico de un proceso. Además, la definición clásica de biocompatibilidad se ciñe a los dos aspectos mencionados, bioseguridad y biofuncionalidad, siendo rechazada por Williams ya que considera que la biocompatibilidad es mucho más compleja y que la definición es demasiado general, por lo que no ayuda a un avance real en el conocimiento de la biocompatibilidad [65]. Dada la importancia del lugar de aplicación y del uso que se vaya a hacer del biomaterial para que éste sea capaz de generar un sistema biocompatible con los tejidos, este autor proporciona a la comunidad científica una nueva definición de biocompatibilidad específica para dispositivos médicos implantables de larga duración, estableciendo que “la biocompatibilidad de un dispositivo médico implantable de larga duración se refiere a la habilidad del dispositivo para llevar a cabo su función prevista, con el grado deseado de incorporación en el huésped, sin obtener ningún efecto indeseable local o sistémico en él” [65]. La biocompatibilidad, por tanto, no es una propiedad de un material, si no una característica del sistema formado por el biomaterial y el huésped [65]. Así pues su evaluación vendrá dada por una batería de ensayos destinados a evaluar el sistema implante-huésped en su conjunto, a través de mediadores de la interacción del sistema (mediadores de biocompatibilidad) [162].

La capacidad de un implante dental de generar un sistema biocompatible con el hueso depende, entre otros, de las propiedades del implante, que comprende: su composición, morfología, porosidad, rugosidad, forma, tamaño, densidad, esterilización, mojabilidad, la química de su superficie, la duración del contacto con el huésped, su tasa de degradación y los productos que de ésta genere [164, 165]. Entre

estas, las características de la superficie como la topografía, la estructura química y la hidrofiliidad o hidrofobicidad, son las que tienen una mayor importancia en la biocompatibilidad. Los biomateriales con superficies rugosas y estructura porosa mejoran la adhesión celular y el crecimiento de tejido en su interior [165].

La implantación y la lesión de los tejidos desencadenan una cascada de repuestas inflamatorias y de reparación de las lesiones típicas denominadas, en su conjunto, reacción a cuerpo extraño [164]. La respuesta biológica de reacción a cuerpo extraño que tiene lugar tras la implantación es una inflamación aguda y crónica, seguida de la formación de una cápsula fibrosa [166]. La fase aguda dura desde unas horas a unos días y está marcada por exudación de líquidos y proteínas, así como una reacción neutrófila. En la fase aguda, se limpia el lugar de la lesión y se forma una matriz provisional, para ello se produce vasodilatación y exceso de flujo sanguíneo hacia el lugar lesionado, liberándose numerosas citoquinas y factores de crecimiento. Los leucocitos se adhieren al endotelio de los vasos sanguíneos y se infiltran hasta el lugar de la lesión. Es entonces cuando los monocitos son requeridos en el lugar lesionado y se diferencian en macrófagos. Si el estímulo inflamatorio persiste, como sucede en el caso de la continua presencia del implante, se da paso a la inflamación crónica [164].

La inflamación crónica es histológicamente menos uniforme comparada con la inflamación aguda, y depende generalmente del tamaño y/o grado de la lesión. Esta fase está generalmente caracterizada por la presencia de monocitos, macrófagos y linfocitos, así como por la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo para la reestructuración del área afectada. La formación de vasos sanguíneos es esencial para la reparación de la lesión, abasteciendo de los nutrientes necesarios. Finalmente, el tejido de granulación de la matriz provisional es reemplazado por una matriz extracelular (ECM). La ECM actúa, no sólo como una matriz física, sino que además es un modulador crucial de los procesos biológicos, incluyendo la diferenciación, la regeneración y la reparación [164].

El último paso de la reacción a cuerpo extraño supone aislar al implante mediante una cápsula fibrosa vascular y de colágeno de cerca entre 50 – 200 μm de grosor [164]. Sin embargo, la cápsula no puede formarse a menos que tengan lugar estímulos físico-químicos en el tejido alrededor del implante. Una alta densidad de fibrocitos puede ser un criterio para la evaluación biológica a corto plazo de implantes [166]. Los macrófagos tienen un número de funciones en la reparación de heridas y en la respuesta a largo plazo a la implantación, que incluye la actividad fagocítica y el control de la actividad fibroblástica, por eso los macrófagos pueden influir en la formación de colágeno. La extensión de la formación de la cápsula depende de varios factores,

incluyendo el tamaño del implante, su forma, la topografía y química de su superficie, tamaño de poro y el lugar de implantación. Está descrito en literatura que las superficies rugosas de los implantes generan grandes cápsulas, y las superficies lisas normalmente generan cápsulas más finas [166].

Tempranamente en la respuesta inflamatoria y de reparación de lesiones, los macrófagos están activados en cuanto se adhieren a la superficie del material. Aunque está generalmente considerado que las propiedades físicas y químicas del biomaterial son responsables de la activación macrófaga, la naturaleza de los eventos posteriores, en relación a la actividad de los macrófagos en la superficie, no está clara. Los macrófagos tisulares, derivados de los monocitos circulantes en sangre, pueden unirse para formar células gigantes multinucleadas de reacción a cuerpo extraño. Grandes células gigantes de reacción a cuerpo extraño, conteniendo un gran número de núcleos, son típicamente encontradas en la superficies de los biomateriales [67, 167].

El sistema implante-huésped no puede ser evaluada en su conjunto por un solo test. Debido a su complejidad, se requiere de una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar los efectos locales y sistémicos del sistema [164]. La familia de Normas ISO 10993 titulada “Evaluación Biológica de Productos Sanitarios” establece los ensayos *in vitro* e *in vivo* necesarios para la **evaluación biológica** de biomateriales según una clasificación con tres parámetros: (1) aplicación (interior o exterior del organismo), (2) lugar de implantación (subdérmico, músculo-esquelético o peritoneal) y (3) tiempo que el biomaterial permanecerá en el organismo [168]. Para los dispositivos médicos implantables de larga duración la norma recoge distintos capítulos que sirven de guía a la hora de la realización de los distintos ensayos, desde ensayos de mutagénesis y toxicidad para la reproducción [169], ensayos de citotoxicidad *in vitro* [170] y toxicidad sistémica [171], evaluación de los efectos locales tras la implantación [172], hasta estudios toxicocinéticos de los productos de degradación [173]. Las agencias de evaluación de productos sanitarios europeas suelen exigir, para la obtención de marcado de conformidad europea (marcado CE), la presentación de, al menos, los resultados que se indican en esta norma.

4.1.1. Evaluación biológica sobre cultivos celulares

Los test *in vitro* se usan principalmente como un primer análisis para evaluar la toxicidad aguda y el comportamiento celular inducido, evitando así el uso innecesario de animales ensayando materiales inapropiados para las células. Los test *in vitro* proporcionan información en relación a la citotoxicidad, genotoxicidad, proliferación y diferenciación celular, siendo más fácil estandarizar y cuantificar que en los test *in vivo*, sin embargo están limitados por la relativamente corta esperanza de vida de las células

en cultivo. Además, las células *in vitro* pueden sufrir deriva fenotípica, debida a la disociación de las células de su geometría tridimensional y/o crecimiento en una superficie bidimensional. La caracterización *in vitro* no es capaz de demostrar la respuesta de los tejidos a los materiales, ya que, además de por todos los motivos anteriores, la respuesta está confinada a una sola línea celular o células primarias de animales. En el caso del cultivo de hueso además existe otra limitación, la falta de carga controlada, ya que el hueso sin carga incrementará su resorción, como se ha visto en pacientes que han permanecido largo tiempo encamados. Por estas razones los modelos animales son esenciales para evaluar la biocompatibilidad, la respuesta de los tejidos y la función mecánica de un material ortopédico o dental antes de su uso clínico en humanos [174].

El zoólogo americano Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales, en 1907, siendo el primer autor que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. Carrel, en 1912, tuvo éxito extendiendo las posibilidades del cultivo celular al mantener y haciendo crecer el tejido conectivo durante otros tres meses. Informó sobre el crecimiento *in vitro* de los tejidos embrionarios de pollo durante años, ayudando a convencer de este modo a la comunidad científica de la utilidad de los cultivos *in vitro* como sistemas experimentales. En 1948, Sanford demostró que una sola célula podía crecer en cultivo. Siete años más tarde Eagle demostró que los complejos extractos celulares hasta entonces usados para el crecimiento celular podían ser reemplazados por una mezcla arbitraria de aminoácidos, vitaminas, cofactores, carbohidratos y sales, suplementados con una pequeña cantidad de proteínas séricas [175, 176].

Un poco más adelante, Conheim fue el primero en describir la presencia de células madre no hematopoyéticas en médula ósea (que Caplan nombró como células madre mesenquimales, MSCs). Conheim propuso que la médula ósea era también una fuente de fibroblastos que contribuía a la regeneración ósea. En la década de los 60, el científico ruso Friedenstein identificó una población de células dentro de la médula ósea de ratón que se adherían rápidamente al plástico, tenían la apariencia de fibroblastos y formaban colonias clonadas *in vitro*. Estas células eran también capaces de generar hueso cuando eran implantadas *in vivo* en localizaciones ectópicas. Desde las descripciones de Friedenstein, numerosos laboratorios han confirmado y ampliado estos hallazgos, mostrando que células aisladas de la médula ósea de humanos pueden ser subcultivadas y diferenciadas *in vitro* en una variedad de tipos celulares mesodérmicos como osteoblastos, condrocitos, adipocitos y mioblastos [177, 178].

Actualmente, se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Cuando nos referimos a un cultivo celular nos estamos refiriendo exactamente a un disgregado celular de un tejido de origen, que se diferencia de éste en que: (1) se ha perdido la organización espacial tridimensional propia del tejido, (2) se han perdido las interacciones heterotípicas entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular, y (3) carece de los componentes sistémicos de regulación, implicados en la regulación de la homeostasis *in vivo*, especialmente los sistemas nervioso y endocrino.

La familia de Normas ISO-10993, en sus apartados específicos de ensayos celulares, indica la importancia de la selección de una correcta línea celular, estableciendo como criterio para esta selección la aplicación final del implante. Así pues, la mayoría de grupos en el ámbito de la regeneración ósea utilizan para sus ensayos *in vitro* líneas celulares relacionadas con el linaje osteoblástico, bien sean precursores (células madre mesenquimales), pre-osteoblastos u osteoblastos [179, 180, 181, 182, 129, 99, 107].

Una de las líneas ampliamente aceptada para este tipo de ensayos es MC3T3-E1, osteoblastos inmaduros procedentes de calvaria de ratón. Esta línea celular fue utilizada con anterioridad por Ren y colaboradores para la evaluación *in vitro* de un recubrimiento híbrido tipo sol-gel [127]. Su morfología es fusiforme, y cuboidal en confluencia, tienen una tasa de replicación de 24 horas y son capaces de diferenciar a osteocitos en medio de diferenciación.

Durante la fase inicial de desarrollo (días 1 a 9 de cultivo), las células MC3T3-E1 replican activamente, dando altas tasas de síntesis de ADN y aumento en número celular, pero aún son osteoblastos inmaduros, ya que mantienen la morfología fusiforme y existe ausencia de expresión de ALP y de acumulación de matriz colágena extracelular mineralizada. A partir del día 9 el cultivo, presenta una morfología cuboidal, alcanzando la confluencia, y dejan de crecer. El descenso de la replicación está asociado con la expresión de la función osteoblástica (producción de ALP, transformación de procolágeno en colágeno y deposición de matriz colágena extracelular). La mineralización de la matriz extracelular, que empieza aproximadamente 16 días después del cultivo, marca el final de la fase del desarrollo fenotípico de osteoblastos. La expresión de ALP y la mineralización son dependientes del tiempo, no de la densidad celular. La síntesis de COL I y la acumulación de colágeno se encuentran separadas en los osteoblastos en desarrollo. Aunque la síntesis de colágeno alcanza su mayor pico al tercer día en células aún inmaduras, la acumulación

de matriz extracelular es mínima. Sin embargo, la acumulación de matriz es máxima a los 7 días, cuando la síntesis de colágeno comienza a descender. Por eso la formación de la matriz extracelular es función de los osteoblastos maduros. El ácido ascórbico y el β -glicerol fosfato son esenciales para la expresión del fenotipo osteoblástico, obteniendo expresión de ALP y mineralización de la matriz extracelular. El ácido ascórbico no estimula la expresión génica de COL I, pero es necesario para la deposición del colágeno en la matriz. Además, induce la actividad de la ALP en células maduras pero no en las inmaduras. El β -glicerol fosfato juega acciones sinérgicas con el ácido ascórbico para promover la acumulación de colágeno y la actividad de ALP en células postmitóticas diferenciadas. La mineralización de cultivos maduros requiere la presencia de β -glicerol fosfato.

De este modo, las células MC3T3-E1 muestran una expresión característica de osteoblastos, secuencial y dependiente del tiempo, análoga a la de la formación de hueso *in vivo*. La secuencia del desarrollo asociada con la diferenciación de MC3T3-E1 proporciona un modelo útil para estudiar las señales que median el cambio entre proliferación y diferenciación en las células óseas, así como provee de un sistema de cultivo renovable para examinar el mecanismo molecular de maduración de osteoblastos y la formación de matriz extracelular similar a la ósea [183].

4.1.1. Evaluación biológica tras la implantación *in vivo*

Para la evaluación de los efectos locales después de la implantación, una parte de esta norma da indicaciones para el establecimiento de sistemas semicuantitativos de evaluación, basados en escalas cualitativas de puntuación de los distintos parámetros que intervienen en el proceso de respuesta de reacción a cuerpo extraño (ISO 10993-6, Anexo E) [172]. Cada uno de los autores establece su propio sistema basándose en dichas indicaciones.

Así pues, encontramos que Shen evaluó la intensidad de la inflamación por presencia de células inflamatorias, empleando una escala de 0 a 4 según el número de células por campo de visión, siendo: 0 = 0 células, 1 = de 1 a 5 células, 2 = de 5 a 10 células, 3 = infiltrado intenso y 4 = infiltrado denso compacto. Para la fibrosis y la neovascularización empleó otra escala de puntuación entre 0 y 4, siendo: 0 = ausente, 1 = pequeña, 2 = leve, 3 = moderada, 4 = amplia/extensa. Dos evaluadores, independientes y desconocidos por el personal experimental del estudio, realizaron la evaluación. Tres secciones de cada muestra fueron seleccionadas al azar y evaluadas, siendo el valor de la puntuación media de cada parámetro el empleado por Shen para la comparación entre los distintos materiales a evaluar en su estudio [165].

Ikarashi sin embargo, evaluó ocho aspectos de respuesta del tejido: (1) la extensión de la hemorragia, (2) la distribución, en la cápsula fibrosa formada alrededor del implante, de fibroblastos, (3) neutrófilos, (4) basófilos, (5) macrófagos, (6) células gigantes y (7) linfocitos, y (8) la infiltración de células inflamatorias alrededor de la cápsula fibrosa. La intensidad de estos aspectos histológicos se ordenó como - = 0 (ninguno), + = baja frecuencia, ++ = frecuencia moderada y +++ = alta frecuencia, calculándose el total de puntuación [184].

Otros autores miden también el grosor de la cápsula fibrosa y su evolución en el tiempo, como MacNeill [185] y Li [166].

Los efectos locales tras la implantación de algunos recubrimientos sol-gel han sido evaluados con anterioridad. Como ejemplo, con materiales sol-gel sinterizados basados en sílice, encontramos al grupo de Gil-Albarova que implantó probetas de vidrio en diáfisis de conejo para regeneración en defecto de tamaño crítico óseo [186]; al grupo de Ballarre que realizó un estudio de osteointegración en rata para evaluar recubrimientos basados en TEOS y MTES sobre implantes de acero 316L [187]; o al grupo de Meseguer-Olmo que desarrolló materiales basados en sílice ricos en iones Ca y P funcionalizados con gentamicina, efectivos a la hora de liberar localmente el antibiótico en modelo de osteointegración en tibia de conejo [188]. En ninguno de ellos se registró ninguna reacción biológica adversa. También se encuentran registrados en la bibliografía estudios de evaluación biológica de materiales sol-gel basados en sílice sintetizados a bajas temperaturas, como están sintetizados los materiales de los que se trata en esta Tesis. Así encontramos al grupo de Mansur, que implantó en rata discos basados en 5 precursores metálicos diferentes (TEOS, 3-mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS), 3-aminopropil trimetoxisilano (APTES), GPTMS y 3-isocianato propil trimetoxisilano (ICPES)) sintetizados vía sol-gel y cargados con insulina [189]; Gerritsen y colaboradores determinaron la biocompatibilidad para recubrimientos sol-gel en conejo, con una formulación basada en TEOS dopado con macromoléculas, diseñados para sensores de glucosa implantables subcutáneamente [190]; Radin y colaboradores implantaron discos subcutáneos y gránulos de material sol-gel, basado en el precursor tetrametilortosilano (TMOS), en cresta ilíaca de conejos, concluyendo que no existían efectos adversos en los tejidos tras su implantación [142]. Sin embargo, la bibliografía no recoge estudios de evaluación biológica de las formulaciones concretas propuestas en este trabajo.

4.2. Osteointegración

La observación del hueso en contacto directo con la superficie del implante, tras un tiempo determinado de estudio, sin tejido fibroso interpuesto, fue reportado por primera vez por Brånemark (1983) y descrito como osteointegración [191]. Posteriormente, el concepto ha sido revisado por otros autores con el paso del tiempo. Algunos de ellos defienden que es esencial para la eficacia de los implantes dentales establecer una unión hueso-material mecánicamente sólida con una fusión completa entre la superficie del material y la del tejido óseo sin una capa de tejido fibroso intermedia, sin embargo Albrektsson y colaboradores demostraron, en 1985, que la zona entre el implante y el hueso está compuesta por un área de 20 a 40 nm de espesor que contiene proteoglicanos y colágeno no mineralizado [17]. Quizá esta unión mediante una capa fibrosa fina no acompañada de inflamación crónica (osteofibrointegración), reproduzca mejor las condiciones mecánicas de la unión del diente en condiciones fisiológicas, sin embargo el debate sigue abierto.

La osteointegración del implante determinará el éxito de la implantación. La evaluación de la osteointegración se realiza mediante estudio histomorfométrico de imágenes obtenidas de cortes histológicos provenientes de implantación en un modelo animal adecuado.

4.2.1. Modelos animales

Los modelos animales permiten la evaluación de materiales en situación de carga y descarga durante tiempos prolongados, en estados de salud o enfermedad de los tejidos y diferentes edades. Además permite, no sólo estudiar el efecto de los implantes en su periferia, sino también en zonas alejadas y en el estado de salud general del organismo. Aunque los modelos animales pueden simular la situación fisiológica y mecánica clínica en humanos, debemos recordar que es tan sólo una aproximación, ya que cada modelo animal tiene unas ventajas y desventajas únicas.

El coste de adquisición y cuidado de animales, disponibilidad, aceptación por la sociedad, tolerancia al cautiverio y la facilidad de estabulación, además de que la esperanza de vida sea apropiada para la duración del estudio, son factores a tener en cuenta para la elección de la especie animal del estudio [172].

Para ensayar implantes dentales y ortopédicos, es necesario usar un modelo reproducible y en el que las dimensiones del implante sean comparables a aquellas utilizadas en humanos. El número y tamaño de implantes a ensayar influirá directamente en la especie animal a elegir para el estudio. El diseño de implantes más

utilizado son el tipo tornillo o cilíndrico. Los implantes en forma de tornillo tienen la ventaja de proporcionar una mejor estabilidad. Los implantes ortopédicos tipo tornillo pueden medir de 2 a 4,5 mm dependiendo de la especie elegida, los tornillos de 4,5 mm generalmente se reservarán para especies grandes como perro, oveja o cerdo [174, 172].

Frecuentemente, los test mecánicos utilizados en tejidos derivados de estudios *in vivo* incluyen ensayos de desenroscado, extracción (*pull-out*) y expulsión (*push-out*). Estos ensayos se utilizan para evaluar la fuerza de interacción entre el hueso y la superficie del implante. Altos valores encontrados en estos ensayos indican una buena integración entre el hueso y la superficie del implante o, en el caso de materiales porosos, un elevado grado de crecimiento de nuevo hueso en el interior de los poros del implante. Además de los aspectos mecánicos, se deben analizar los aspectos topográficos. Así pues, se debe caracterizar la superficie de los implantes, la interacción hueso-implante, e incluso estimar la composición química de la superficie. Para ello, se realizan estudios con microscopio de fluorescencia y microscopio electrónico de barrido.

Específicamente para estudios de interacción hueso-implante, debe haber un consenso entre las características específicas del hueso de la especie; microestructura, composición, modelado óseo y capacidad de remodelación, ya que son importantes cuando luego se extrapolen los resultados a la situación humana. Se debe tener en cuenta, como se dijo en un principio, que el tamaño del animal sea apropiado para el número y tamaño de implantes elegido [172].

La especie animal no primate más similar en estructura ósea a los humanos es el perro; sin embargo, existen implicaciones éticas al uso de animales de compañía para investigación médica. Es por esto que es preferible el uso de especies como la oveja, la cabra o el cerdo. Sin embargo el manejo, estabulación y disponibilidad de estas especies pueden suponer un problema, lo que no es crítico en el caso de los conejos, aunque de todas estas especies sea la que más alejada está del humano [174, 192]. Esta gran diferencia puede suponer una dificultad a la hora de extrapolar resultados de estudios en conejo. El conejo es una de las especies animales más comúnmente utilizadas para investigación médica debido a su tamaño y manejabilidad. El conejo es también práctico porque alcanza la madurez ósea poco después de la madurez sexual, alrededor de los seis meses de edad. Esto hace que el conejo sea la especie más comúnmente utilizada para la selección de materiales implantables, antes de ser testados en modelos animales superiores [174, 193].

De entre las diferentes razas de conejos, la raza Nueva Zelanda blanco es la más comúnmente utilizada en investigación para fines científicos, puesto que es menos agresiva y tiene menos problemas de salud comparado con otras razas [192].

Las localizaciones anatómicas de defectos creados quirúrgicamente dependen del objetivo del estudio. En este sentido, las más comunes suelen ser las lesiones y osteotomías en hueso largo (tibia y radio). En 2010, Monfoulet y colaboradores determinaron el modelo de defecto en diáfisis tibial como modelo de regeneración de hueso cortical y el modelo de defecto en epífisis tibial como modelo de regeneración de hueso trabecular [194]. Sennerby y colaboradores, en 1992 [195], usaron la metáfisis tibial de conejo como modelo de implantación en mandíbula, que contiene más hueso cortical, y el cóndilo femoral como modelo de implantación en la maxila, constituida por mayor cantidad de hueso trabecular.

Existe una cierta controversia a la hora de comparar resultados obtenidos en diferentes modelos animales. Esto se debe a que, en algunos casos, biomateriales que parecen funcionar en animales pequeños no lo hacen en animales de mayor tamaño. Para explicar estos resultados, se han esgrimido cuestiones tales como el tamaño absoluto del defecto o las diferencias fisiológicas y metabólicas entre especies, por lo que la mejor opción es trabajar con diferentes modelos animales. Es por eso que se considera de gran importancia la elección correcta del material a estudio, el tipo de lesión a realizar y el modelo animal elegido [1].

El modelo de osteointegración en tibia de conejo es un modelo ampliamente empleado según la bibliografía para la evaluación biológica de recubrimientos de implantes dentales [172, 192, 196, 197, 198, 199, 200].

4.2.2. Histomorfometría

La histomorfometría se define como la rama cuantitativa de la histología que mide y cuenta rasgos morfológicos. En las últimas décadas la histomorfometría en hueso no descalcificado se ha convertido en una línea de trabajo claramente establecida [201]. La limitación de las técnicas histológicas impuso, hasta la década de los 60, la descalcificación del hueso para la evaluación del tejido óseo. La técnica de descalcificación e inclusión en parafina presenta una serie de inconvenientes: (1) imposibilidad de diferenciar entre hueso mineralizado y no mineralizado (y por tanto la no cuantificación del osteoide), (2) retracción de la zona de contacto entre el hueso mineralizado y la médula ósea dificultando el recuento celular, (3) imposibilita el estudio de la dinámica ósea mediante marcaje con fluorocromos, ya que distorsiona el depósito de calcio en la matriz amorfa [202, 203]. Con el ensayo histomorfométrico se

consigue valorar la integridad del biomaterial y cuantificar el hueso que crece en la interfaz. Esto permite analizar la estructura de los recubrimientos y la capacidad de reabsorción de los materiales osteoconductores utilizados en la regeneración ósea [203].

Para la evaluación histomorfométrica se han descrito diversos parámetros. La Densidad de Área Ósea, expresada como BAr/TAr (por *Bone Area/Total Area*), determina la cantidad de hueso mineralizado con relación a la zona de tejido total, indicando la densidad de hueso que se encuentra en el área regenerada. Ésta es una variable estática bidimensional que se corresponde en valor tridimensional con el Volumen Óseo, expresado como BV/TV (por *Bone Volume/Total Volume*).

La Unión Hueso-Implante o BIC (por *Bone Implant Contact*), determina la cantidad de hueso mineralizado que se encuentra en íntimo contacto con la superficie del implante. Se trata de una longitud y por tanto es una variable estática bidimensional que se corresponde en valor tridimensional con la Superficie Ósea, expresada como BS (por *Bone Surface*).

El cálculo de estos parámetros se realiza sobre las imágenes de histología capturadas por un sistema de imagen acoplado a un software de histomorfometría. La imagen se binariza, pudiendo segmentar del tejido seleccionado [204]. Es difícil la estandarización y comparación de los distintos ensayos puesto que las mediciones histomorfométricas de la osteointegración dependen de factores como la orientación del corte histológico o el tipo de hueso donde esté colocado el implante [205]. Sin embargo, sigue siendo una herramienta válida para la evaluación biológica comparativa de biomateriales para tejido óseo.

Bernhardt realizó un estudio histomorfométrico de osteointegración de implantes dentales de titanio, en forma de tornillo, en maxila de cerdo miniatura tras ocho semanas. Estableció un límite en la superficie externa del implante, definiendo un área, en el interior de la cual estableció la región de interés (ROI, *Region of Interest*) en la que realizar las mediciones. Se midió el BIC y la densidad de área ósea en la ROI, a la cual denominó BIV (Figura 16). Las medidas se realizaron sobre 3–4 secciones histológicas por implante, de las cuales calculó la media [191].

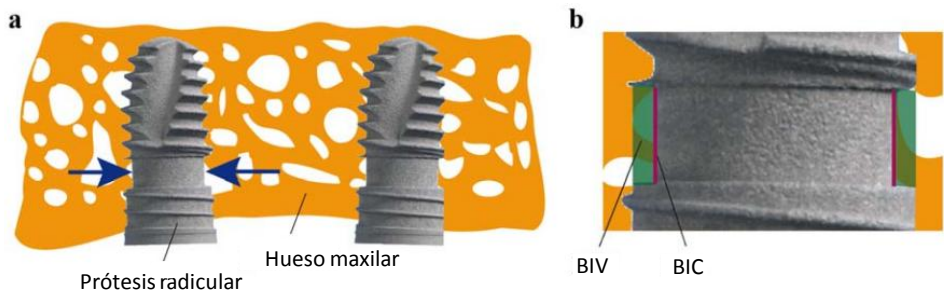


Figura 16. Modelo de osteointegración de implantes dentales en maxila de cerdo miniatura tras ocho semanas de implantación de Bernhardt (a), regiones de interés para la evaluación histomorfométrica del nuevo hueso formado (BIC: *bone implant contact*, BIV: *bone implante volume*) [191].

Nkenke realizó un estudio histomorfométrico de osteointegración de implantes dentales de titanio en mandíbula de cerdo miniatura. En él se estudiaron tres parámetros: (1) el BIC (desde la primera rosca coronal hasta la más apical), (2) la densidad ósea entre las roscas (área de hueso dentro de las roscas/área total entre roscas) y (3) la densidad ósea peri-implante (área de hueso/área de tejido), estas dos últimas medidas dentro de una ROI definida desde la superficie del implante hasta una distancia lateral de 2 mm que envolvía el implante desde la cuarta rosca hasta la más apical [206] (Figura 17).

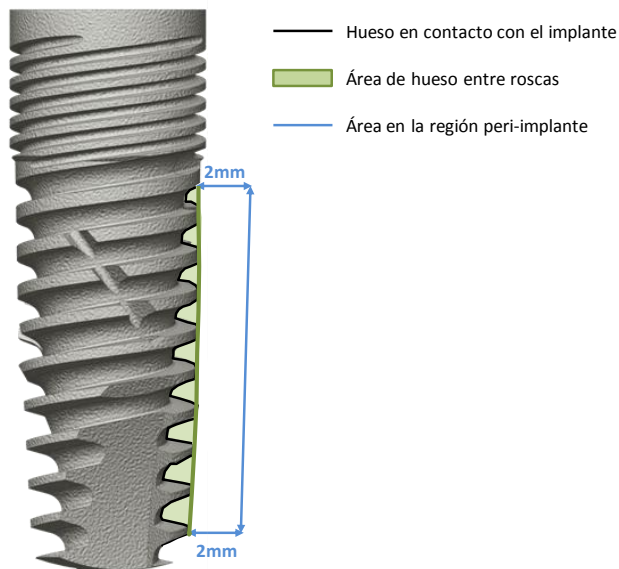


Figura 17. Variables histomorfométricas del modelo de osteointegración de implantes dentales en maxila de cerdo miniatura de Nkenke; BIC (línea negra recorriendo el perfil del implante), densidad ósea entre las roscas (verde) y densidad ósea peri-implante en una ROI definida a una distancia lateral del implante de 2 mm (azul) [206].

Ramires, en 2003, realizó una experimentación animal con implantes dentales de titanio con recubrimiento sol-gel basado en TEOS e iones Ca y P, implantando en metáfisis tibial y femoral de conejo. La sección central de cada réplica fue evaluada para calcular el BIC y la cantidad de hueso dentro del área interna de las roscas [181].

4.2.3. Evaluación de la osteointegración de materiales sol-gel

En relación con la experimentación *in vivo* publicada de los recubrimientos sol-gel basados en sílice aplicada al campo de la osteointegración, encontramos en un primer lugar materiales sinterizados. Como los del grupo de Ramires, que evaluó recubrimientos de TEOS ricos en iones Ca y P sobre implantes dentales de titanio en metáfisis tibial y femoral de conejo a 12 semanas, tras estudios mecánicos e histomorfométricos encontraron mayor resistencia al desenroscado en relación al titanio sin recubrir y una mayor cantidad de hueso en contacto con el implante [181]. El grupo de Ballarre desarrolló un recubrimiento sol-gel, usando MTES como precursor, que evaluaron biológicamente mediante la implantación de probetas, de acero inoxidable 316L recubiertas, en tibia y fémur de rata durante 60 días, demostrando histológicamente que, tras largos periodos de ensayo, se mejoraba la osteointegración del acero [187]. El grupo de Meseguer-Olmo desarrolló materiales basados en sílice, ricos en iones Ca y P, funcionalizados con gentamicina que resultaron efectivos a la hora de liberar localmente el antibiótico en modelo de osteointegración en tibia de conejo, promoviendo el crecimiento óseo durante el proceso de resorción [188].

El grupo de Radin, que tradicionalmente también trabajaba en cerámicas y vidrios bioactivos [207, 208, 209, 210, 211, 212, 213] con aplicación sobre tejido óseo, comienza en 2001 a sintetizar materiales vía sol-gel no sinterizados [214]. En 2005, publicaron un artículo usando como precursor TMOS, con distintas concentraciones de Ca y P y vancomicina en su red, que implantaron subcutáneamente en forma de film libre y en forma de gránulos, procedentes de fractura del film libre, en cresta ilíaca de conejo [142]. Es el único ensayo *in vivo* que este grupo realiza de sus materiales. A partir de 2006, sus publicaciones se centran en materiales basados en el precursor puro TEOS como vehículo liberador de vancomicina y bupivacaína, tanto en film como en forma de microesferas [143, 115]. En 2013, evalúa la relación entre la eficacia de liberación de sustancias y el tamaño molecular de éstas, integrando en la red de TEOS distintos tamaños moleculares de polisacáridos [215]. Sintetizan éste material basado en TEOS tanto en forma de recubrimiento líquido sintetizado vía sol-gel (para tornillos, clavos y placas de osteosíntesis de Ti6Al4V) [143] como en forma de microesferas, gracias a una modificación en el proceso de síntesis que permite obtener tamaños

controlados de microesferas para utilizar como sistema de encapsulamiento y liberación controlada en biomedicina [216].

La mayoría de investigación *in vivo* en este campo está más orientada a la aplicación de estos materiales como vehículos, para la liberación controlada de moléculas para aplicación en biomedicina, que para la osteointegración en sí. En el año 2000, Gerritsen desarrolló recubrimientos basados en TEOS para sensores de glucosa implantables; en 2005, el grupo de Mansur desarrolló vehículos de liberación controlada de insulina con precursores puros TEOS, MPTMS, APTES, GPTMS e ICPEs [189]; y Radin, en 2007, desarrolló un recubrimiento, con el que recubrió clavos de osteosíntesis de aleación de titanio, como vehículo de liberación de vancomicina para el tratamiento de la osteomielitis en fracturas abiertas [143].

A partir de este punto, se abandonaron los precursores metálicos basados en silicio y se optó por otros materiales para la realización de los materiales sol-gel, entre los que podemos encontrar algunos ejemplos de recubrimientos para mejorar la osteointegración de implantes. Como Catauro que, en 2014, desarrolló films de matriz inorgánica basada en circonio con policaprolactona (PCL) sobre titanio para mejorar la osteointegración [157]. Más recientemente, He y colaboradores han desarrollado un recubrimiento multicapa, vía sol-gel en varios pasos, que consta de una capa superficial de hidroxiapatita, una capa media de fluoro-hidroxiapatita y una interna de óxido de titanio, con el objetivo de aumentar la bioactividad y la velocidad de osteointegración de implantes ortopédicos y dentales [217].

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Como se ha mostrado en la introducción, ya existen dos Tesis Doctorales publicadas [92, 218] producto de la investigación conjunta del equipo de trabajo formado por la Universidad del País Vasco (EHU), la Universidad Jaume I de Castellón (UJI) y el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tissular (CBIT) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Así como se desarrollaron dos patentes nacionales: “Procedimiento para la obtención de un recubrimiento sol-gel polimérico y recubrimiento sol-gel polimérico” (ES2384762 (A1)) y “Recubrimientos osteoinductores para implantes dentales” (ES2421263 (A1)), esta última licenciada a la empresa Ilerimplant S.L. y en fase de extensión a Estados Unidos y Europa. Todos estos documentos describen los procesos de síntesis de las distintas familias de recubrimientos desarrollados, realizando una caracterización físico-química completa de films libres de sol-gel y de films depositados sobre planchas lisas de acero inoxidable. Fruto de los resultados de estos trabajos, se decidió comenzar la caracterización biológica completa de estos materiales, objetivo principal de esta Tesis.

A raíz de la revisión de la bibliografía presentada, se planteó el objetivo principal de esta Tesis Doctoral: la evaluación biológica de los nuevos recubrimientos sol-gel desarrollados y aplicados a implantes dentales de titanio para (1) ser empleados como vehículos biomoleculares que (2) induzcan la neoformación ósea, para (3) mejorar y acelerar la osteointegración del implante. Para el cumplimiento del objetivo principal, se han establecido los objetivos específicos que se describen a continuación.

1. Determinar la calidad de la síntesis y deposición de los recubrimientos.
2. Caracterizar la rugosidad, la hidrofilia, la degradación y la liberación de silicio de los nuevos recubrimientos sol-gel curados sobre titanio granallado.
3. Descartar la toxicidad de los recubrimientos sol-gel sobre titanio granallado.
4. Caracterizar el comportamiento *in vitro* de osteoblastos frente a titanio granallado recubierto con nuevos recubrimientos sol-gel, evaluando la capacidad del recubrimiento para inducir adhesión, proliferación y diferenciación celular.
5. Evaluar los efectos locales después de la implantación, incluyendo la reacción a cuerpo extraño, la capacidad de osteointegración y la capacidad de osteoinducción

de los nuevos recubrimientos sol-gel implantados *in vivo* sobre prótesis radiculares comerciales de titanio granallado.

6. Seleccionar el prototipo final de recubrimiento sol-gel aplicado a implantes dentales de titanio.

Para el cumplimiento del objetivo principal se planteó un plan de trabajo inicial formado por dos Fases de Caracterización Biológica (Figura 18). En una primera fase (**Fase de Caracterización I**), se realizó un cribado celular entre tres formulaciones pertenecientes a tres series distintas de recubrimientos sol-gel; MTMOS:TEOS, VTES:GPTMS y MTMOS:GPTMS. De los resultados de este cribado, se seleccionó una formulación de cada familia para su evaluación tras la implantación *in vivo* (caracterización *in vivo*). Como consecuencia de los resultados de la **Fase de Caracterización I**, se seleccionó la mejor formulación (Formulación X) a la que someter a mejoras físico-químicas. Estas mejoras sobre la Formulación X fueron evaluadas biológicamente en la segunda fase (**Fase de Caracterización II**) del plan de trabajo que a continuación se muestra, hasta finalmente determinar la formulación que constituirá la formulación del Prototipo Final.

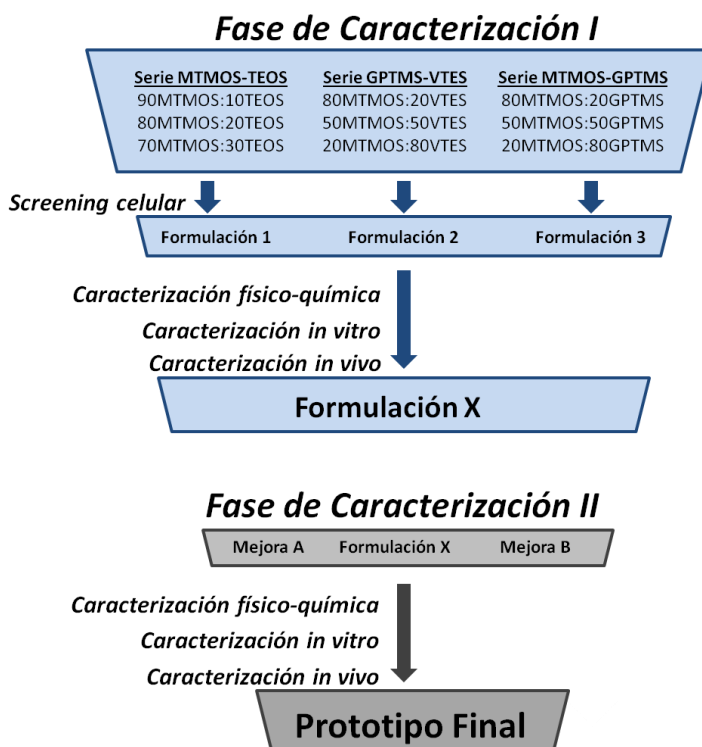


Figura 18. Esquema del plan de trabajo propuesto para esta Tesis Doctoral.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Síntesis sol-gel y recubrimiento

1.1. Síntesis de los recubrimientos

El equipo de ingenieros químicos del grupo de investigación de la Universidad Jaume I realizó la síntesis de los recubrimientos sol-gel, siguiendo el procedimiento de síntesis ácida *one step* (en un paso), según protocolo descrito en 2012 por Hernández-Escolano M. en su Tesis Doctoral [92], [219]. Se tomaron como precursores de partida metil-trimetoxisilano MTMOS (Sigma-Aldrich Ref. M6420), vinil-trietoxisilano VTES (Sigma-Aldrich Ref. 75560), glicidoxipropil-trimetoxisilano GPTMS (Sigma-Aldrich Ref. 440167) y tetraetil-ortosilicato TEOS (Sigma-Aldrich Ref. 333859), en la Figura 19 se muestra un esquema de la estructura molecular de cada uno de ellos.

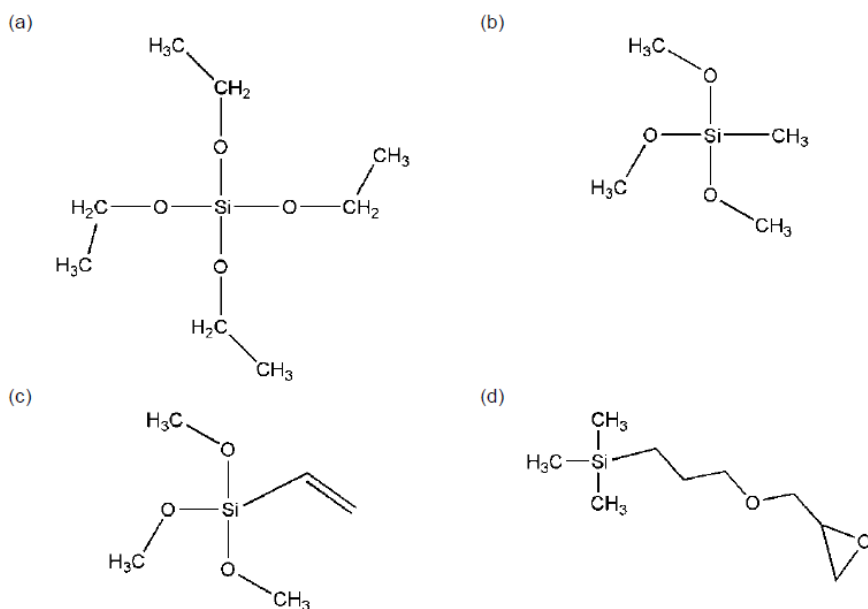


Figura 19. Esquema de la estructura molecular de los precursores de silicio (a) TEOS, (b) MTMOS, (c) VTES y (d) GPTMS.

Basándose en los resultados obtenidos por Hernández-Escolano para los recubrimientos puros de los cuatro precursores [92, 94, 219, 220], se decidió utilizar el MTMOS como precursor base para dos de las series de recubrimientos. Se decidió

introducir TEOS al precursor base MTMOS y variar su proporción en la serie, fundamentalmente, para reducir las temperaturas de curado y para aumentar la degradación del material y su carácter hidrófilo [221]. El grado de hidrofilia del recubrimiento es un factor importante en la adhesión celular [55] y la degradación de las redes facilita la liberación de compuestos de silicio que pueden favorecer la osteoinducción [101, 99, 222]. Así mismo, para la otra serie de base MTMOS se decidió introducir GPTMS y variar su proporción para aumentar el número de grupos epoxi en la superficie, actuando como grupos activos donde poder unir agentes orgánicos como péptidos o proteínas que favorezcan la osteoinducción. La tercera serie de recubrimientos se desarrolló con VTES como precursor base, a la que por una parte se le introdujo GPTMS para aumentar el número de grupos epoxi y funcionalizar su superficie, y por otra se añadió TEOS. Esta última serie (VTES:TEOS) se descartó debido a los mejores resultados celulares iniciales obtenidos por la serie VTES:GPTMS. La posibilidad de crear una tercera serie utilizando de base GPTMS y añadiendo distintas proporciones de TEOS también se rechazó al comprobar, en ensayos iniciales, que resultaban muy hidrófilos y degradaban muy rápido.

Para la obtención de los soles, se siguió el procedimiento esquematizado (Figura 20) y las proporciones que se muestran en la Tabla 1. Se preparó una disolución de los precursores en isopropanol con una relación en volumen 1:1, que se agitó mediante agitador magnético. Se añadió, gota a gota, agua destilada en cantidad estequiométrica para la hidrólisis de los grupos alcoxi presentes en los precursores. Con el fin de acelerar el proceso de hidrólisis, el agua añadida fue acidificada hasta pH 1 mediante adición de ácido nítrico. Esta disolución se dejó en agitación, a 150 rpm durante una hora, para permitir la completa hidrólisis de todos los grupos. Para estabilizar el sistema se dejó en reposo durante otra hora.

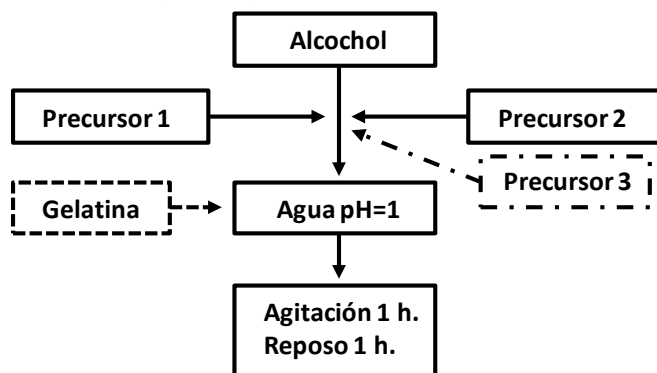


Figura 20. Esquema de síntesis del sol, de dos precursores (línea continua), de la formulación triple (líneas y puntos) y de la formulación de dos precursores con gelatina (línea discontinua) (esquema basado en [92]).

	Serie MTMOS:TEOS			Serie VTES:GPTMS			Serie MTMOS:GPTMS		
Relación en moles	9:1	8:2	7:3	8:2	1:1	2:8	8:2	1:1	2:8
Alcohol:precursor	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
Agua hidrólisis pH=1	Esteq.	Esteq.	Esteq.	Esteq.	Esteq.	Esteq.	Esteq.	Esteq.	Esteq.
Nomenclatura	9M:1T	8M:2T	7M:3T	8V:2G	5V:5G	2V:8G	8M:2G	5M:5G	2M:8G

Tabla 1. Relaciones volumétricas alcohol:precursor de las tres mezclas molares de los dos precursores de cada serie de formulaciones (arriba) y de las dos modificaciones realizadas a la Formulación X (abajo). La relación precursor:agua de hidrólisis siempre es la estequiométrica. Se muestra la nomenclatura de cada formulación con la que a partir de ahora se citarán.

La Formulación X, resultado de la **Fase de Caracterización I**, resultó ser la formulación con el 70 % de MTMOS y el 30 % de TEOS (7M3T). Las modificaciones sobre la formulación consistieron en dos estrategias: (1) añadir un tercer precursor GPTMS (para funcionalizar la superficie de los recubrimientos mediante apertura del anillo epoxi) manteniendo el porcentaje del 30 % de TEOS para aumentar su hidrofiliya y degradación, y (2) añadirle gelatina para aumentar la adhesión celular al implante mediada por integrinas. La adición del tercer precursor (GPTMS) se realizó junto a los dos precursores (MTMOS y TEOS) en el momento de mezclar los alcoxisilanos. Se disolvió la gelatina, en un ratio del 2,36 % en masa, en una disolución al 0,1 M de HCl a pH 1. A esta disolución se le añadió la mezcla de alcohol y precursores (MTMOS y TEOS).

En la Tabla 2 se muestra las proporciones de cada uno de los precursores, de alcohol y de agua empleados para la síntesis de los nuevos recubrimientos, además de la nomenclatura de cada formulación con la que a partir de ahora se citarán.

	Formulación X + 3er precursor	Formulación X + Gelatina
	35MTMOS:35GPTMS :30TEOS	70MTMOS:30TEOS+ 0,9%Gelatina
Relación en moles	7(1:1):3	7:3
Alcohol:precursor	1:1	1:1
Agua hidrólisis pH=1	Esteq.	Esteq.
Nomenclatura	3X	7M:3T+G

Tabla 2. Relaciones volumétricas alcohol:agua de los nuevos recubrimientos y su nomenclatura.

1.2. Recubrimiento de las muestras

Al obtener la fase sol del sistema, se procedió a su aplicación sobre los distintos sustratos, que deben encontrarse desengrasados y limpios de impurezas.

Cuando se requirió recubrir portaobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro (Afora S.A., Grupo Fisher, Madrid; España) para la caracterización *in vitro* de la **Fase de Caracterización I**, previamente fueron limpiados mediante baño de ultrasonidos en etanol durante 5 minutos a 30 W de potencia utilizando Sonoplus HD 3200 (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlín; Alemania), acabando el proceso con la inmersión, en repetidas ocasiones, del sustrato en agua destilada y, por último, en etanol. Posteriormente, los sustratos de vidrio se secaron en estufa a 150 °C. Se activó la superficie del vidrio, por medio de plasma de argón que aumenta la mojabilidad de la superficie, para que el recubrimiento esté presente de forma uniforme en toda la superficie. Se realizó un tratamiento en cámara de plasma con flujo de argón de 200 sscm durante 300 segundos a presión de 50 Pa y 300 W de energía. Una vez limpios y activados, los portaobjetos de vidrio se recubrieron mediante el método de *drop-coating*, consiguiendo un recubrimiento homogéneo y continuo de gel dejando caer una gota de 10 µl de sol sobre la superficie.

Las superficies metálicas utilizadas para la evaluación biológica *in vitro* de la **Fase de Caracterización II** fueron discos de titanio grado 4 CP de 12 mm de diámetro, 1,2 mm de espesor y 0,5 g de peso, con una topografía heterogénea proporcionada por un tratamiento de superficie combinando un microbulado de corindón blanco con un ataque ácido (Figura 21). Estos discos, proporcionados por Ilerimplant S.L. (Lérida; España), ya fueron suministrados limpios, libres de impurezas y esterilizados mediante radiación gamma, al igual que las prótesis radiculares empleadas para las distintas fases de experimentación animal. Las prótesis radiculares, implantes dentales de conexión interna de titanio grado 4 CP GMI® modelo Frontier, de 3,75 mm de diámetro por 8 mm de longitud, con el mismo tratamiento superficial que los discos (ADS®, *Advanced Double-Grip Surface*), también fueron suministradas por la empresa Ilerimplant S.L. (Figura 21).



Figura 21. Imágenes ampliadas de los discos de titanio (izquierda) empleados para la evaluación *in vitro* de los recubrimientos y de los implantes de titanio (derecha) utilizados en las fases de experimentación *in vivo*, todos ellos suministrados por Ilerimplant S.L.

Ambas superficies metálicas se recubrieron mediante la técnica *dip-coating*, que consta de tres etapas: (1) inmersión a velocidad controlada de la pieza en la fase sol,

dejándola durante un tiempo controlado sumergida, (2) extracción de la pieza a velocidad controlada, la misma que la de inmersión, y (3) drenaje de la pieza (Figura 22). Para realizar la inmersión de la muestra metálica en la fase sol en condiciones controladas se utilizó un sistema ascensor KSVDC (KSV Instruments Oy, Helsinki; Finlandia) a una velocidad de inmersión de 100 cm/min y tiempo de inmersión de un minuto, siendo la velocidad de extracción de 100 cm/min, igual que la de inmersión.

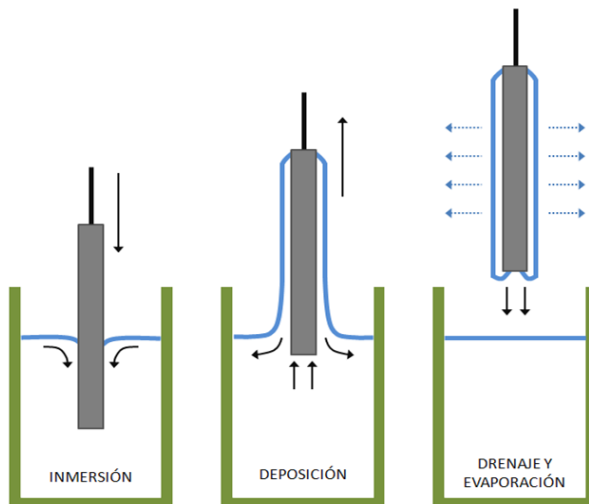


Figura 22. Esquema de método de recubrimiento de superficies mediante la técnica *dip-coating* [92].

1.3. Curado de las muestras

Después de recubrir las muestras, éstas se sometieron, en disposición vertical, a un tratamiento de secado en estufa consistente en una isoterma a 50 °C durante 15 minutos y una rampa de temperatura hasta la temperatura de curado, a una velocidad de 3 °C/min. Este tratamiento permite la eliminación gradual del agua y de los disolventes, evitando la aparición de grietas o burbujas. Con el objetivo de conseguir una total densificación del recubrimiento y el secado completo del mismo, se realizó un segundo tratamiento a temperatura y tiempo variable, según requerimientos de cada formulación, como se indica en la Tabla 3 y la Tabla 4.

	Serie MTMOS:TEOS			Serie VTES:GPTMS			Serie MTMOS:GPTMS		
Nomenclatura	9M:1T	8M:2T	7M:3T	8V:2G	5V:5G	2V:8G	8M:2G	5M:5G	2M:8G
Temperatura (°C)	80	80	80	100	140	140	100	140	140
Tiempo (min.)	120	120	120	90	90	90	90	90	90

Tabla 3. Temperatura y tiempo de curado del segundo curado para los materiales de la *Fase de Caracterización I.*

	Formulación X	Formulación X+ 3er precursor	Formulación X+ Gelatina
	70MTMOS:30TEOS	35MTMOS:35GPTMS :30TEOS	70MTMOS:30TEOS+ 0,9%Gelatina
Nomenclatura	7M:3T	3X	7M:3T+G
Temperatura (°C)	80	80	80
Tiempo (min.)	120	120	120

Tabla 4. Temperatura y tiempo de curado del segundo curado para los materiales de la *Fase de Caracterización II*.

Tras el tratamiento de curado, los distintos sustratos de ensayo fueron esterilizados para su uso en ensayos celulares y de experimentación animal con el fin de realizar una evaluación biológica. Para comprobar que el recubrimiento se depositaba y curaba con éxito, los implantes recubiertos se analizaron en el Servicio de Microscopía de la UPV con microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) ULTRA™ 55 (Zeiss, Oberkochen; Alemania). Las prótesis fueron recubiertas con una fina capa de oro para la toma de imágenes de la totalidad del implante a 5 kV.

A continuación se recoge en la Figura 23, a modo de resumen, un esquema global del proceso de obtención de los materiales evaluados en esta Tesis, desde el momento de su síntesis por mezcla de precursores, alcohol y agua, hasta la obtención de las películas densas tras el curado de la fase sol depositada sobre el titanio.

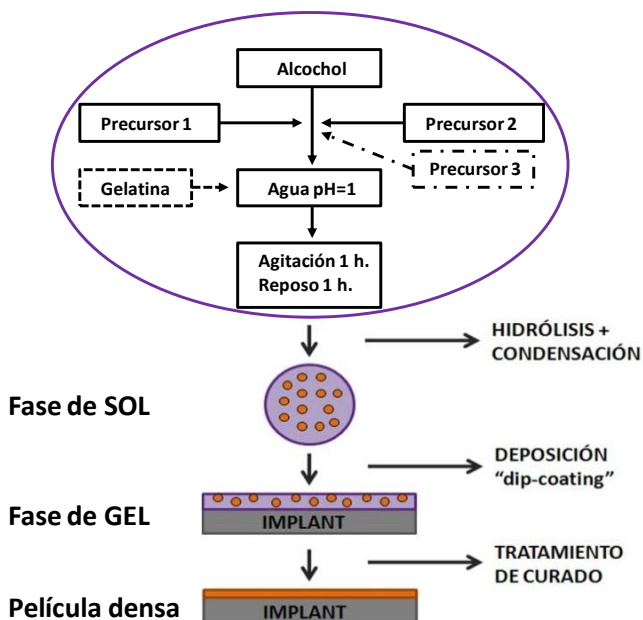


Figura 23. Esquema global de la síntesis de sol-gel y obtención de los materiales sobre un implante metálico (modificación de [92]).

2. Caracterización físico-química

La caracterización físico-química y topográfica, de todos los materiales, tanto de las formulaciones evaluadas *in vitro* en HistoCell S.L. como las evaluadas en el Centro de Biomateriales (CBIT), así como las formulaciones ensayadas *in vivo* pertenecientes a ambas fases de caracterización, fue realizada por el equipo de ingenieros químicos del Centro de Biomateriales de la Universidad Politécnica, de la Universidad Jaume I y de la Universidad del País Vasco, formando parte de las Tesis Doctorales de cada uno de ellos, algunas ya publicadas [92, 218], así como de algunos artículos [220, 219, 94]. Debido a esto, y a que estos ensayos fueron realizados sobre plancha de acero inoxidable o cubreobjetos de vidrio, en este apartado tan sólo se recogerán, de todos aquellos ensayos realizados, sólo los determinados a conocer la tasa de degradación de los recubrimientos y la liberación de silicio obtenida de esta degradación.

El resto de ensayos físico-químicos, mostrados en este capítulo, se llevaron a cabo sobre discos de titanio puro comercial grado 4 de 12 mm de diámetro, 1,2 mm de espesor y 0,5 g de peso con tratamiento superficial ADS® (ADS®, *Advanced Double-Grip Surface*). Estos ensayos estuvieron destinados a caracterizar la superficie de los recubrimientos mediante microscopía electrónica de barrido, perfilometría, ángulo de contacto y ensayos de bioactividad, mediante inmersión en fluido corporal simulado (SBF, del inglés *Simulated Body Fluid*), así como la adhesión al sustrato. Todos estos ensayos (a excepción de la perfilometría que fue realizada por personal investigador de la Universidad Jaume I) fueron realizados por la autora de esta Tesis en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad Politécnica de Valencia.

2.1. Rugosidad

La rugosidad de las superficies, sobre todo su micro y nanotopografía, determinan muchos de los procesos celulares tales como la adhesión y la diferenciación, como se comentó en la Introducción de esta Tesis. Así pues, era imprescindible caracterizar la topografía de la que partíamos (discos de titanio granallado) y la topografía resultante tras recubrirla con las distintas formulaciones híbridas sol-gel.

Para ello, la superficie de los discos de la evaluación celular fue analizada mediante perfilometría y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM). La superficie de los implantes también fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

Perfilometría

Con el objetivo de estimar comparativamente el cambio que los recubrimientos provocan en la macrotopografía de las superficies granalladas, se realizó un estudio de perfilometría de los discos de titanio recubiertos con los materiales híbridos compuestos por las mezclas 7M3T, 5M5G, 7M3T+G y 3X.

Las muestras se prepararon recubriendo cada disco granallado hasta la mitad, dejando una zona sin recubrir y la otra recubierta de acuerdo al esquema siguiente (Figura 24):

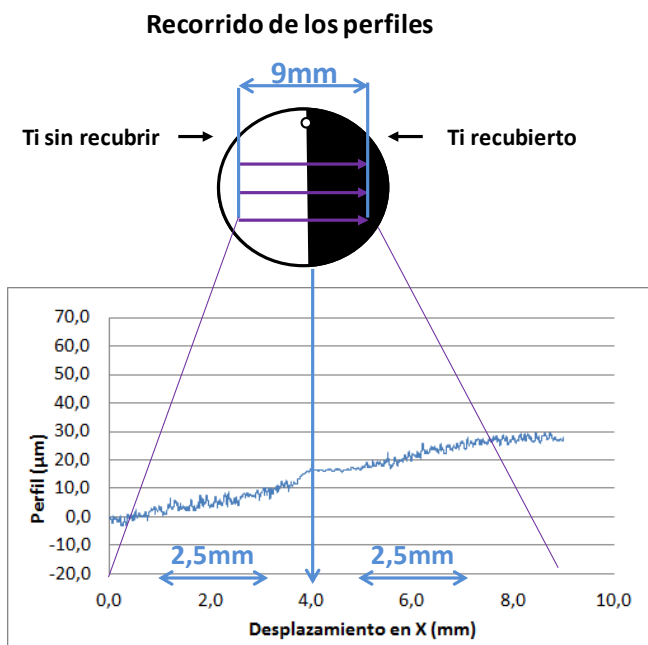
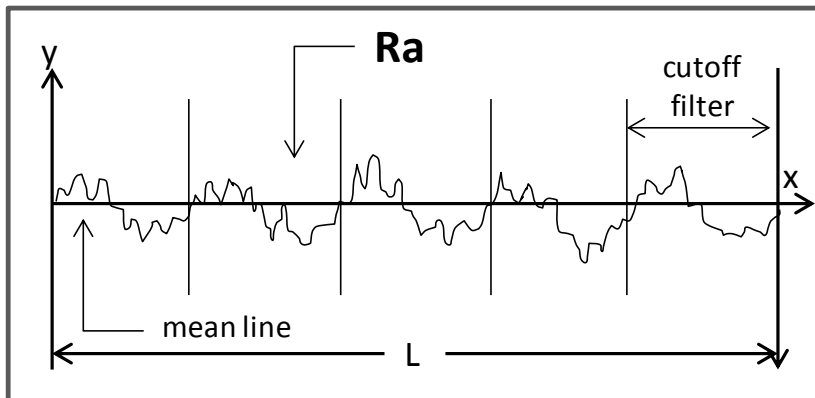


Figura 24. Esquema de preparación de las muestras y localización de las medidas en el ensayo de perfilometría.

Se realizaron tres medidas del perfil lineal en cada disco, en la zona central, con un recorrido de 9 mm (diámetro del disco), iniciándose siempre el recorrido desde la zona no recubierta hasta la zona recubierta (de derecha a izquierda en la Figura 24).

El equipo utilizado para llevar a cabo el estudio fue un perfilómetro mecánico Dektak 6 (Veeco Instruments Inc., Nueva York; EEUU). La determinación de la rugosidad media (R_a) se realizó a través del software del equipo, considerando un intervalo de recorrido de aproximadamente 2,5 mm de cada una de las zonas, recubierta y no recubierta, para la determinación del parámetro R_a , aplicando una frecuencia de corte de 1000 μm . R_a representa la rugosidad media y está reconocida

como la desviación promedio de la línea media cuya función analítica se muestra en la siguiente figura (Figura 25):



$$R_a = \frac{1}{L} \int_{x=0}^{x=L} |y| dx$$

Figura 25. Función analítica utilizada por el software del perfilómetro mecánico para determinación de la rugosidad media (R_a) [223].

Se observó que los discos presentaban un perfil cóncavo, probablemente debido al mecanizado que estos sufren en su fabricación. Por este motivo, y para determinar la rugosidad media, se realizó la corrección del desplazamiento en altura y se ejecutó el cálculo del parámetro R_a teniendo en cuenta simplemente la rugosidad derivada de la topografía propia de la superficie de los discos. Se realizaron tres réplicas de cada formulación y se calculó en qué porcentaje los distintos recubrimientos reducían la macroporosidad del titanio granallado.

Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Debido a que la variación de la macrotopografía superaba el milímetro, fue imposible plantear la posibilidad de utilizar el microscopio de fuerza atómica (AFM) para evaluar la micro- y nanotopografía, por lo que se empleó el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) que permite, trabajando a voltajes bajos, un gran detalle de las superficies sin recubrir. Así pues, mediante mediciones en imágenes de FESEM, se caracterizó la variación en la micro- y nanotopografía inducida por cada formulación de recubrimiento (7M3T, 7M3T+G y 3X) sobre la superficie de titanio granallado de los discos empleados para los estudios *in vitro* de la **Fase de Caracterización II**. Se realizaron tres réplicas para los discos y tan sólo una para las prótesis, debido a falta de material.

Se empleó un equipo ULTRA™ 55, las imágenes se tomaron a 1 kV. No hizo falta recubrir los discos pero sí las prótesis radicales, que fueron recubiertas con una fina capa de oro, tomando en este caso las imágenes a 5 kV.

Para los discos, se tomaron imágenes para, al menos, dos lugares distintos de cada réplica (a 3.000X y 30.000X). Para las prótesis, se tomaron imágenes de todo el implante a 19X (el mínimo permitido), de las roscas de la cabeza y el cuerpo del implante (a 100X – 150X) y de la cresta de las roscas (a 500X).

2.2. Hidrofilia

Otra de las propiedades físicas de una superficie que afecta de manera crítica en el comportamiento celular es la hidrofilia, ya que de ella depende la adsorción de proteínas en la superficie. El grado de hidrofilia de los recubrimientos también influirá en los fenómenos de degradación de éstos y, por consiguiente, en la liberación de silicio y gelatina atrapados en su red sol-gel. Para medir comparativamente el grado de hidrofilia/hidrofobia de los distintos recubrimientos (7M3T, 5M5G, 7M3T+G y 3X) sobre la superficie de los discos granallados se determinó el ángulo de contacto formado entre una gota de agua y el sustrato estudiado (Figura 26) [34].

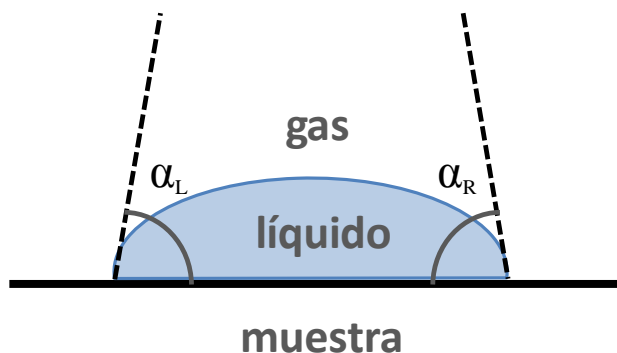


Figura 26. Esquema de medida del ángulo de contacto entre un líquido y un material (esquema modificado de [92]).

Las muestras se prepararon recubriendo cada disco granallado hasta la mitad, dejando una zona sin recubrir y la otra recubierta, igual que se prepararon para el ensayo de perfilometría, tal y como indica la Figura 27.

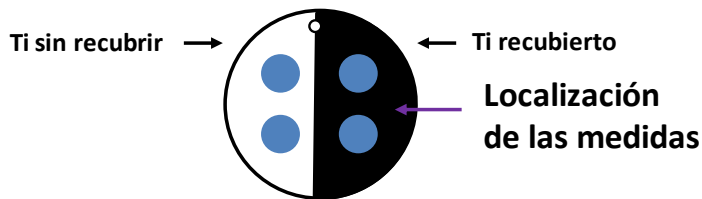


Figura 27. Esquema de preparación de las muestras y localización de las medidas en el ensayo de ángulo de contacto. Para cada disco se tomaron dos medidas en cada una de las zonas (Ti sin recubrir y Ti recubierto), una derecha (R, del inglés *right*) y otra izquierda (L, del inglés *left*).

Se empleó un equipo Dataphysics OCA20 (Dataphysics Corp., California; EEUU) que cuantifica el ángulo formado entre el perímetro de la gota dispensada y el recubrimiento. Los ensayos se realizaron con agua destilada a temperatura ambiente y con un volumen de gota constante de 1 μl (1,20 μl reales) a una velocidad de 0,49 segundos y un tiempo de espera antes de tomar la medida de 10 segundos. Se tomaron dos medidas en cada muestra (R; derecha y L; izquierda) y se realizaron 3 réplicas por material, se calcularon las medias y las desviaciones estándar. La significación de los resultados fue determinada empleando el programa estadístico SPSS 17.0 ($p < 0,05$). Para la comparación de medias de más de dos muestras se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y para la comparación de medias de dos muestras se empleó un Test T-Student, ambos test se realizaron siempre y cuando el Test de Levene determinara la homogeneidad de la varianza. Para los conjuntos de datos en los que no se cumplió la homocedasticidad, se realizó un Test no paramétrico de Kruskal Wallis de k muestras independientes. Las tablas resultado del estudio estadístico se muestran en el **ANEXO 1** para la **Fase de Caracterización I** y en el **ANEXO 2** para la **Fase de Caracterización II**.

2.3. Bioactividad

Los materiales bioactivos presentan una característica común en la interfaz con el hueso después de su integración. Por ejemplo, el Bioglass®, la hidroxiapatita y la vitrocerámica A-W, revelan una capa de apatita en la interfaz que es mediadora de la integración con el hueso. Evaluaciones histológicas *in vivo* muestran que esta capa de apatita se forma en la superficie de estos materiales en una etapa temprana del periodo de inmersión, y que más tarde la matriz ósea se integra a esta apatita. Esta capa de apatita consiste en cristales nanométricos de una apatita que contiene iones de carbono, una estructura defectuosa y de baja cristalinidad. Estas características son similares a las de la fase mineral del hueso, por lo que las células encargadas de la regeneración del hueso pueden proliferar en la apatita y diferenciarse para formar una matriz extracelular compuesta por apatita biológica y colágeno. Como resultado, el

hueso circundante se encuentra en contacto directo con la superficie de la capa de apatita. Cuando este proceso ocurre, se crea un enlace químico entre el hueso mineral y la superficie de apatita para disminuir la energía interfacial existente entre ambas [15, 224].

El modelo de bioactividad mediante fluido corporal simulado (SBF, del inglés *Simulated Body Fluid*) es ampliamente utilizado para la evaluación *in vitro* de la capacidad de biomineralización de diferentes superficies de biomateriales. El modelo consiste en la inmersión de las muestras en un fluido corporal simulado acelular y libre de proteínas, con una concentración de iones, pH y temperatura aproximadamente equivalente a la del plasma sanguíneo humano, como medio para la nucleación de apatita. La capacidad de los biomateriales de nucleación de apatita, que mimetiza la mineralización inicial del hueso en la superficie del implante, puede ser correlacionada con la bioactividad del hueso *in vivo* [111]. Esto significa que la capacidad *in vivo* del biomaterial de unirse al hueso puede predecirse, previamente a ensayos animales, por la formación de apatita en su superficie mediante este modelo de bioactividad *in vitro*. Sin embargo, comparado con el modelo de bioactividad con SBF, el proceso *in vivo* es mucho más complejo, ya que proteínas, enzimas y factores biológicos juegan un papel crucial en este proceso [224, 225].

Por ello, la bioactividad fue analizada mediante el estudio de la capacidad de los recubrimientos de formar apatita en su superficie en contacto con fluido corporal simulado [111]. Para este estudio se utilizó una modificación del SBF original de Kokubo de 1991 [226], que llamaremos 27-Tris-SBF, corrigiendo los valores de bicarbonato e iones Cl^- para acercarse más a los valores presentes en el plasma sanguíneo humano [111, 227] (Tabla 5).

	Humanos (mM)	SBF (mM)	27-Tris-SBF (mM)
Na^+	142,0	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5	2,5
Cl^-	103,0	147,0	125,0
HCO_3^-	27,0	4,2	27,0
HPO_4^{2-}	1,0	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5	0,5
pH	7,2-7,4	7,4	7,4

Tabla 5. Comparación de valores entre el plasma sanguíneo humano y sus réplicas sintéticas (SBF y 27-Tris-SBF).

En un vaso de precipitados con 960 ml de agua ultrapura (MilliQ, EDM Millipore, Massachusetts; EEUU) se añadieron, a temperatura ambiente y con agitación vigorosa de 3 minutos tras cada paso, cloruro sódico, bicarbonato de sodio, cloruro potásico y fosfato disódico. Se calentó la disolución hasta 37 °C y se le añadió cloruro de magnesio hexahidratado, se volvió a agitar vigorosamente durante 3 minutos y se le añadieron 9 ml de ácido clorhídrico 1 M gota a gota, se agitó durante otros 3 minutos. A la disolución se le adicionó entonces cloruro de calcio dihidratado y Tris-hidroximetilaminometano, se siguió agitando y se ajustó el pH con ácido clorhídrico 1 M a 37 °C hasta llegar a 7,4. Se enrasó la disolución a 1.000 ml y se guardó en estufa a 37 °C en botella de cristal [227].

Los discos recubiertos (7M3T, 7M3T+G y 3X) y los controles permanecieron 7 y 14 días en placa multipocillo P24 con 1 ml de 27-Tris-SBF a 37 °C y 5 % CO₂. Tras estos periodos, los discos se cambiaron a una nueva placa y se secaron una hora en estufa a 60 °C antes de ser llevados al Servicio de Microscopía de la Universidad Politécnica de Valencia para su observación en microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) ULTRA™ 55.

Además, los discos fueron pesados, registrando la ganancia de peso como valor de deposición de hidroxiapatita en su superficie como medida de bioactividad de las superficies. La significación de los resultados fue determinada empleando el programa estadístico SPSS 17.0 ($p < 0,05$). Para la comparación de medias de más de dos muestras se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y para la comparación de medias de dos muestras se empleó un Test T-Student, ambos test se realizaron siempre y cuando el Test de Levene determinara la homogeneidad de la varianza. Para los conjuntos de datos en los que no se cumplió la homocedasticidad, se realizó un Test no paramétrico de Kruskal Wallis de k muestras independientes. Las tablas resultado del estudio estadístico se muestran en el **ANEXO 1** para la **Fase de Caracterización I** y en el **ANEXO 2** para la **Fase de Caracterización II**.

2.4. Degradación

Sobre vidrio

La cinética de degradación de los recubrimientos fue estudiada, puesto que los recubrimientos fueron diseñados para ser biodegradables. Los recubrimientos sol-gel degradan hidrolíticamente, es por ello que para la realización de este ensayo se prepararon recubrimientos obtenidos sobre cubreobjetos de vidrio (18 mm), mediante el proceso *flow-coating*, que se sumergieron en agua destilada durante a 37 °C. La

cinética de degradación fue estimada mediante pérdida de peso del recubrimiento durante cinco periodos de 7, 14, 30, 50 y 63 días. El ensayo se realizó por triplicado.

Sobre titanio

Puesto que la motivación del desarrollo de estos nuevos recubrimientos es la de otorgar de capacidad osteoinductora a la superficie del titanio mediante la liberación de silicio, es imprescindible por tanto estudiar la tasa de degradación de las redes sol-gel. La degradación hidrolítica de la red (rotura de los enlaces Si – O – Si) da como resultado la liberación de compuestos de silicio, entre otros ácido ortosilícico $\text{Si}(\text{OH})_4$ [91] que induce la diferenciación de osteoblastos y la formación de matriz extracelular mineralizada [101, 103].

En Tesis anteriores [92, 218], se estudió la degradación y liberación de algunas de las formulaciones sobre plancha de acero inoxidable. Puesto que la naturaleza iónica y la rugosidad del soporte y el espesor de recubrimiento adherido son tan distintos, en la presente Tesis se consideró importante la realización de un ensayo adicional de degradación de las formulaciones 7M3T, 7M3T+G y 3X sobre los mismos discos de titanio granallado empleados para toda la ***Fase de Caracterización II***.

Tres réplicas de cada formulación se pesaron en una microbalanza Ax205 (Mettler Toledo, Barcelona; España). Se sumergieron en 1 ml de agua ultrapura (MilliQ) en una placa multipocillo P24, permaneciendo bajo las mismas condiciones que los cultivos celulares realizados, 37 °C y 5 % CO_2 . Tras cada periodo de estudio, las muestras se extrajeron, se cambiaron a una nueva placa, se secaron en estufa a 60 °C durante 1 hora y se pesaron. El agua se retiró en un tubo ependorff y se reservó para el ensayo de liberación.

Los pesos se recogieron en una tabla, se calcularon las medias y las desviaciones estándar y se realizó un estudio estadístico mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, para comparación de más de dos muestras. Para la comparación de medias de dos muestras se empleó un Test T-Student. Ambos test se realizaron siempre y cuando el Test de Levene determinara la homogeneidad de la varianza. Para los conjuntos de datos en los que no se cumplió la homocedasticidad, se realizó un Test no paramétrico de Kruskal Wallis de k muestras independientes. Las tablas resultado del estudio estadístico se muestran en el **ANEXO 1** para la ***Fase de Caracterización I*** y en el **ANEXO 2** para la ***Fase de Caracterización II***.

2.5. Liberación

Durante la degradación hidrolítica, los recubrimientos sol-gel liberan silicio en forma de compuestos de silicio, entre otros $\text{Si}(\text{OH})_4$. Para determinar el grado de liberación de silicio se utilizó la Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS). El equipo utilizado fue un Agilent 7700 Series ICP-MS.

Para la realización de este ensayo de liberación, se prepararon recubrimientos obtenidos sobre portas de vidrio (18 mm) mediante el proceso *flow-coating*. El ensayo se llevó a cabo sumergiendo los portas recubiertos en 50 ml de agua MilliQ, dentro de una estufa a 37 °C, durante un tiempo de 5 semanas. Se tomaron alícuotas de 50 μl a 1, 2, 3, y 5 semanas de ensayo. La extracción de cada alícuota se repuso con 50 μl de agua MilliQ. El ensayo se realizó por triplicado.

Esta técnica sólo detecta el silicio que se encuentra en su forma iónica (Si^{+4}). Por este motivo, para asegurarnos de que todo el silicio liberado estaba ionizado, a cada alícuota se le realizó una digestión ácida, para ello se utilizaron de disoluciones de HNO_3 al 0,5 % (v/v) y HCl al 0,1 % (v/v).

2.6. Adherencia al sustrato

En 2011, de entre los ensayos realizados por Hernández-Escolano para su Tesis Doctoral, se realizó un ensayo *ex vivo* de resistencia al enroscado de los recubrimientos de la **Fase de Caracterización I** en rodilla de cerdo (Figura 28). Con imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) se comprobó que los recubrimientos resistieron al roscado y posterior desenroscado, el microanálisis mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX, del inglés *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*).

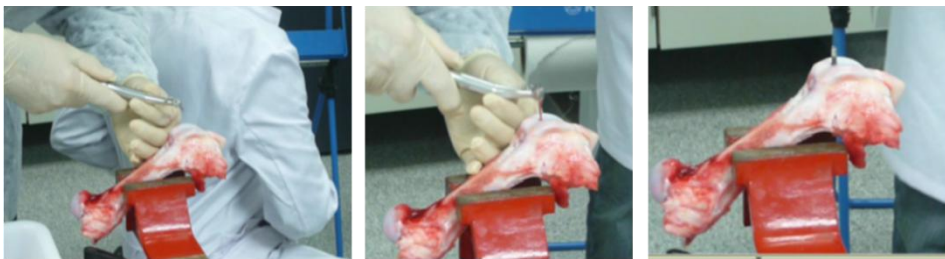


Figura 28. Ensayo *ex vivo* de resistencia al proceso quirúrgico de implantación en rodilla de cerdo.

Para la **Fase de Caracterización II** se realizó un ensayo *in vivo* de resistencia al proceso quirúrgico de implantación en tibia de conejo para los recubrimientos 7M3T,

7M3T+G y 3X. Una réplica de cada formulación fue implantada en tibia de conejo, siguiendo el mismo procedimiento quirúrgico que el empleado para la evaluación de la biocompatibilidad del sistema hueso-implante y la eficacia de la osteointegración. Al finalizar la implantación, el animal fue eutanasiado y las muestras fueron extraídas mediante sección longitudinal de la tibia sin sufrir desenroscado, ya que éste, además de afectar al recubrimiento, eliminaría el hueso anclado al implante en el proceso quirúrgico. Este modelo se diseñó como una mejor aproximación al escenario real (Figura 29, izquierda).

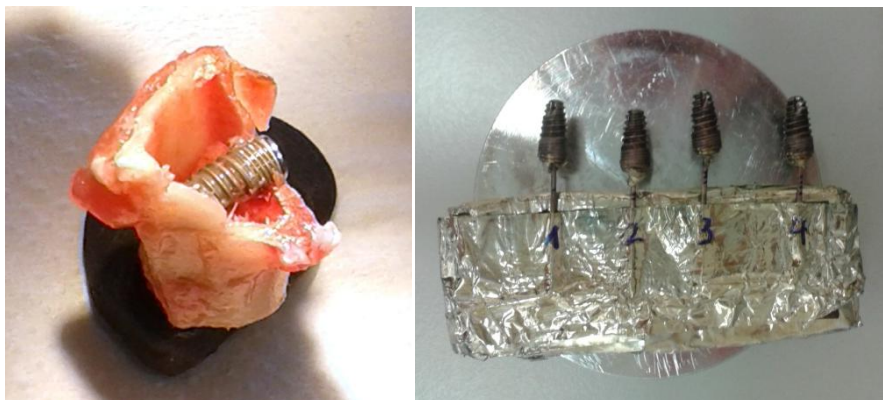


Figura 29. Detalle de la extracción del implante (izquierda) y montaje de las prótesis para la evaluación del estado del recubrimiento tras el proceso quirúrgico de implantación (derecha).

Las muestras fueron lavadas con sumo cuidado con suero fisiológico y se llevaron al Servicio de Microscopía para su evaluación con microscopio electrónico de barrido de emisión de campo ULTRA™ 55 (FESEM). Se realizó un montaje conductor adecuado para su correcta visualización (Figura 29, derecha) y fueron recubiertas con una fina capa de oro. Se tomaron imágenes de la totalidad del implante a 19X (el mínimo permitido), de las roscas de la cabeza y el cuerpo del implante (a 100X – 150X) y de la cresta de las roscas (a 500X) a 5 kV.

3. Caracterización biológica

3.1. Evaluación biológica sobre cultivo celular

Para la **Fase de Caracterización I** se subcontrató a la empresa Histocell S.L. (Vizcaya; España) para que realizara un *screening* celular de todas las formulaciones, de las tres series de recubrimientos desarrollados, en base a su proliferación celular (mediante MTT) y al grado de mineralización (mediante tinción de Rojo Alizarina), en cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano

(hAMSCs) a las que se indujo su diferenciación a osteoblastos. Para estos ensayos, el soporte utilizado para el crecimiento celular fueron cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro, recubiertos por la técnica de *spin-coating* y esterilizados en campana con luz ultravioleta, con una distancia al foco aproximada de 80 cm – 100 cm y durante un periodo de 20 minutos por cada cara, siendo la última la recubierta. Los controles fueron los mismos cubreobjetos sin recubrir, a los que se les aplicó el mismo procedimiento de esterilización. Histocell entregó las lecturas de absorbancia (densidad óptica, D.O.) de ambos ensayos para la realización de su estudio estadístico. De los resultados de este estudio, se seleccionó la formulación de cada serie que sería implantada en la primera experimentación animal.

De los resultados de la primera experimentación animal, se eligieron las formulaciones que mejor comportamiento demostraron *in vivo*, realizándose las mejoras químicas convenientes y llevando a las nuevas formulaciones a una **Fase de Caracterización II**, en la que se estudiaría su carácter citotóxico (mediante MTS) y, cómo estos influyen en la adhesión y proliferación (mediante cuantificación de ADN total) y en la diferenciación celulares (mediante cuantificación de alcalina fosfatasa, ALP). La caracterización celular de esta segunda fase de experimentación se realizó en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tissular (CBIT) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Este estudio *in vitro* se realizó con células MC3T3-E1, una línea celular comercial de osteoblastos procedente de calvaria de ratón (RCB1126, Riken Cell Bank, Ibaraki; Japón). Esta línea celular fue utilizada con anterioridad por Ren y colaboradores para la evaluación *in vitro* de un recubrimiento híbrido tipo sol-gel [127]. Se utilizaron discos de 12 mm de diámetro, 1,2 mm de espesor y 0,5 g de titanio CP grado 4 y tratamiento superficial ADS® (*Advanced Double-Grip Surface*), que suministró Ilerimplant S.L. limpios y estériles en paquetes de 10 unidades. En el Departamento de Ingeniería de Sistemas Industriales y Diseño de la Universidad de Castellón (UJI), los discos fueron recubiertos mediante técnica de *dip-coating*, empaquetados individualmente, codificados y suministrados al CBIT. Los discos control no fueron recubiertos. La esterilización (de discos recubiertos y discos control) fue realizada mediante luz ultravioleta, con una distancia al foco aproximada de 80 cm – 100 cm durante un periodo de 20 minutos por cada lado. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.1.1. Citotoxicidad por extracto

Cuantificación de la viabilidad celular por actividad mitocondrial (MTS)

La cuantificación de la viabilidad celular mediante MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) es un método colorimétrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables basándose en que, debido a la actividad mitocondrial, la sal de tetrazolio (MTS), en presencia de metosulfato de fenacina (PES), se reduce en las células a formazán, soluble en el medio de cultivo y de color azul oscuro.

Existen dos formas de realizar este ensayo, midiendo la citotoxicidad directa del material (sembrando sobre él) o indirectamente, midiendo la citotoxicidad por extracto del material (añadiendo el extracto del material a las células sembradas en placa). Para este ensayo, se eligió la determinación cuantitativa de la citotoxicidad indirecta por extracto mediante ensayo por MTS, siguiendo la normativa ISO 10993-5 para materiales biomédicos empleando el kit *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*; (Promega, Wisconsin; EEUU). Como material de control positivo (material que al ser ensayado proporciona una respuesta citotóxica reproducible) se utilizó látex [26]. Como material de control negativo (material que al ser ensayado no proporciona ninguna respuesta citotóxica) se sembraron los pocillos sin extracto (pocillo de poliestireno). El blanco del ensayo correspondió a los materiales con extracto pero sin células [170].

Se incubó 0,5 g de muestra (materiales de estudio y discos control) y de látex (control positivo), esterilizadas por luz ultravioleta (en etanol 70 % para el látex), en un volumen de 1 ml (2 ml/1 g) de DMEM (Gibco® -Invitrogen, California; EEUU) durante 24 horas a 37 °C y 5 % CO₂.

Se sembraron células MC3T3-E1 en una placa multipocillo P24 a una densidad celular de 18.400 células/cm² durante 24 horas en DMEM suplementado al 10 % con suero bovino fetal (FBS, ThermoFisherScientific, Massachusetts; EEUU) y 1 % de penicilina/estreptomina (P/S; Lonza, Basilea; Suiza). Transcurrido el tiempo indicado, se retiró el medio, se añadió el extracto y se incubó durante 24 horas, tras las cuales se retiró el medio, añadiendo MTS y DMEM sin rojo fenol (Sigma-Aldrich, Missouri; EEUU) en proporción 1:5. Se incubó a 37 °C y 5 % CO₂ en oscuridad durante 3 horas y se realizó la lectura de absorbancia en un lector de placas multifunción VictorTM3 a una longitud de onda de 490 nm. La cantidad de formazán registrada como resultado de la lectura de absorbancia a 490 nm es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo.

3.1.2. Adhesión y proliferación

Cuantificación de la proliferación celular por actividad mitocondrial (MTT)

El procedimiento para la determinación de la proliferación celular mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es muy similar al descrito con anterioridad para la citotoxicidad, ya que es otra sal de tetrazolio, como el MTS, y como ella es un método colorimétrico. El MTT mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables basándose en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales, de las células metabólicamente activas, de reducir la sal (MTT), de color amarillo e hidrofílica a un compuesto hidrofóbico (formazán), de color azul oscuro. Tras la captación del MTT, las células se rompen y se solubiliza el formazán con dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia de cada muestra es directamente proporcional al número de células viables.

Para la realización del ensayo, la empresa Histocell S.L. primero realizó el acondicionamiento de los materiales mediante incubación a 37 °C con 5% CO₂ durante 16 horas en medio de crecimiento (DMEM-GlutaMAX; Gibco®-Invitrogen, California; EEUU). Tras el acondicionamiento, se retiró el medio y se procedió a la siembra de las hAMSCs sobre los materiales con una densidad celular de 12.500 células/cm² en un volumen de 1,5 ml de medio de cultivo (DMEM-GlutaMAX suplementado al 10 % con FBS (Biochrom, Berlín; Alemania). Tras 0 horas y 1, 7 y 14 días se realizaron las lecturas, a una longitud de onda de 550 nm con un lector de placas (Multiskan Ascent; Ascent Technology LTD., Wellington; Reino Unido), del ensayo de viabilidad celular mediante un kit colorimétrico del tipo MTT (Roche, Basilea; Suiza).

Cuantificación de la adhesión y proliferación celulares por cuantificación del ADN total

La adhesión celular es de los primeros eventos que tienen lugar en la interacción célula/material y su calidad influye en el grado de proliferación y diferenciación que las células logren en contacto con el implante [27]. En este ensayo se evaluó la adhesión celular de MC3T3-E1 tras 12 horas y su proliferación, tras 1, 7 y 14 días de incubación a 37 °C con 5 % CO₂, respecto a la adhesión inicial. Para la detección de este ensayo, se utilizó un kit comercial, con un reactivo ultra sensible con capacidad de tinción fluorescente de ácidos nucleicos, para la cuantificación de ADN de doble cadena de una disolución (DNAT P7 589 Quant-iT Picogreen dsDNA reagent kit; Invitrogen, California; EEUU).

Las condiciones del cultivo fueron idénticas para adhesión y proliferación. Tras el acondicionamiento de los discos en incubación (37 °C con 5 % CO₂), en medio de

crecimiento (DMEM) suplementado con FBS y P/S durante 16 horas, se realizó la siembra de MC3T3-E1 sobre los materiales con una densidad celular de 18.400 células/cm² en P24 y con un volumen de 1 ml (2 ml/1 g) de DMEM suplementado al 10 % con FBS y 1 % de P/S. Tras los periodos de estudio se procedió a la cuantificación del contenido de ADN total en las muestras.

Se lavaron las muestras con DPBS 1X y se depositaron en un microtubo con 950 µl de DPBS 1X a pH 8,1 tamponado con K₂HPO₄ 1 M y se conservaron a - 80 °C. Tras descongelar las muestras, se procedió a la digestión celular para solubilizar el ADN añadiendo 50 µl de proteinasa K (Roche, Basilea; Suiza) a 1 mg/ml y se incubaron 16 horas a 60 °C; posteriormente se inactivó la reacción a 90 °C durante 10 minutos. Se cogieron 86,1 µl de muestra, a los que se añadió 213,9 µl de *Picogreen* (dilución 1:200 en tampón TE) y 300 µl de tampón TE 1X (Promega, Wisconsin; EEUU), y se incubaron 5 minutos protegidas de la luz. Se colocaron 200 µl/pocillo y se realizó la lectura a longitud de onda de 520 nm en un lector de placas VictorTM3. Los resultados se normalizaron respecto a la curva de calibrado realizada para las concentraciones a; 0 µg, 0,2 µg, 0,3 µg, 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg, 2 µg y 3 µg de ADN de solución estándar.

Inmunocitoquímica

Para evaluar la capacidad de los recubrimientos de inducir adhesión en osteoblastos, se realizó un ensayo inmunocitoquímico de algunas de las proteínas que median la adhesión de las células a la superficie de los implantes. El anclaje de las células a la superficie de los implantes, como se describió en el punto 3.3 de la Introducción, se produce a través de la formación de complejos de adhesión celular compuestos por integrinas y proteínas citoplásmicas tales como vinculina, talina y tensina. Dicho anclaje es regulado por quinasas tales como la quinasa de adhesión focal (*Focal Adhesion Kinase, FAK*), cuya autofosforilación de la tirosina 397 (Y397) desencadena la cascada de señalización que recluta las proteínas de adhesión focal. Estos complejos de adhesión, mediado por integrinas, se anclan al citoesqueleto de actina de las células por un lado y por el otro anclan la matriz extracelular [228].

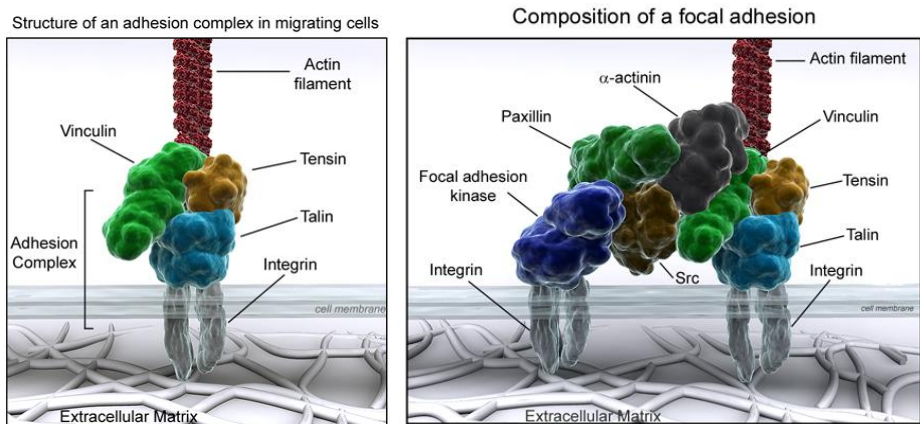


Figura 30. Representación de la estructura del complejo de adhesión (izquierda) y composición de una adhesión focal [229].

Éste es el motivo por el cual se estudió cómo los diferentes sustratos inducen la formación de adhesiones focales. Para ello, se realizó el estudio inmunocitoquímico de tres de las integrinas más importantes en el proceso, la integrina α_v , la integrina α_5 y la integrina β_1 , y de las proteínas involucradas, vinculina, talina y tensina.

Se realizó la siembra de MC3T3-E1, sobre los mismos discos empleados para los ensayos celulares, con una densidad de 5.257 céls/cm², en DMEM suplementado con el 10 % de FBS y 1 % de P/S, y se incubó a 37 °C y 5 % CO₂ durante 3 horas. Tras este periodo, se procedió a retirar el medio de cultivo y lavar hasta 3 veces con DPBS⁺⁺, para eliminar cualquier resto, y se fijaron las células con formalina al 4 % (Sigma-Aldrich) durante una hora a 4 °C. Se lavó nuevamente con DPBS⁺⁺ (3 veces) (Sigma-Aldrich), para retirar completamente el fijador, y se procedió a la realización de la inmunocitoquímica. Primero, se permeabilizaron las membranas 5 minutos a temperatura ambiente con Tritón 0,5 % (Sigma-Aldrich) en PBS, para permitir el acceso de los anticuerpos a epítomos intracelulares (Sigma-Aldrich), seguidamente se lavaron 2 veces las muestras con DPBS⁺⁺. Se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) al 1 % en DPBS⁺⁺ durante 30 minutos a temperatura ambiente para prevenir la unión no específica del anticuerpo a la membrana y evitar el riesgo de tener un elevado número de falsos positivos. Tras este paso, se procedió a añadir el anticuerpo primario correspondiente a cada caso en BSA al 1 % en DPBS⁺⁺, incubándose durante 1 hora a 37 °C y 5 % CO₂. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-vinculina (dilución 1:400, Sigma-Aldrich), anti-talina (dilución 1:400, Sigma-Aldrich), anti-tensina (dilución 1:500, Abcam, Cambridge; Reino Unido), anti-integrina α_v (dilución 1:1000, EMD Millipore, Massachusetts, EEUU), anti-integrina α_5 (dilución 1:1000, EMD Millipore) y anti-integrina β_1 (dilución 1:150, BD PharmingenTM,

California; EEUU). Eliminamos el anticuerpo primario y lavamos 3 veces con Tween 20 (Sigma-Aldrich) al 0,5 % en DPBS⁺⁺. Añadimos el anticuerpo secundario correspondiente a cada primario; *antimouse* Cy3 (dilución 1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Pensilvania, EEUU), *antirabbit* Cy3 (dilución 1:1000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) y *antirat* Cy3 (dilución 1:200, Abcam) en BSA al 1 % en DPBS⁺⁺ y 10 µl por pocillo de falacidina (Bodipy FL, Invitrogen) para poder observar la organización del citoesqueleto de actina, e incubamos durante 1 hora a 37 °C y 5 % CO₂. Repetimos el paso de lavado, esta vez del anticuerpo secundario. Se montaron las muestras sobre los portaobjetos, añadiendo una gota de medio de montaje con DAPI antes de colocar el cubreobjetos (Vectashield®, Vector Laboratories Inc., California; EEUU) para observar los núcleos.

Las muestras se observaron en un microscopio vertical de fluorescencia Eclipse 80i (Nikon Corporation, Tokio; Japón), utilizando los filtros correspondientes en cada caso (Tabla 6). Se realizaron 3 réplicas para cada material y se tomaron fotografías de ellas a 20X y 40X.

	DAPI	FITC	TRITC	Cy5
Excitación	387/11	482/35	543/22	628/40
Emisión	447/60	536/40	593/40	692/40

Tabla 6. Filtros empleados en la detección de fluorescencia en los ensayos inmunocitoquímicos.

Expresión génica (RT-PCR)

Se realizó un estudio comparativo de la expresión del gen Fak, que en ratón codifica la proteína quinasa de adhesión focal (FAK), mediante reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción inversa (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR).

La siembra de MC3T3-E1 tuvo lugar sobre los mismos discos empleados para los ensayos celulares, con una densidad de 21.029 céls/cm², en DMEM suplementado con el 10 % de FBS y 1 % de P/S, y se incubó a 37 °C y 5 % CO₂ durante 3 horas. Tras este periodo de tiempo, se procedió a extraer el ARN con el kit comercial *RNeasy® Micro Kit* (Qiagen, Venlo; Países Bajos), obteniendo finalmente unos 12 µl de extracto, utilizando 1 µl para medir mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000c/2000 UV-Vis, ThermoFisherScientific) la concentración de ARN extraído (ng/µl) para cada muestra.

Para la retrotranscripción, con el kit *SuperScript III RT* (Invitrogen), se utilizó 0,8 µg de ARN, 1 µl de oligo dT₍₁₂₋₁₈₎, 1 µl de dNTPs 10 mM y agua libre de ARNsas hasta un volumen final de 13 µl, que se llevaron 5 minutos a 65 °C en termociclador

(MJMini™ Personal Thermal Cycler, Bio-Rad, California; EEUU). Tras enfriar un minuto en hielo, se añadieron 4 µl de tampón *First Strand 5X*, 1 µl de 0,1 M de ditiotreitól (DTT) y 2 µl de *SuperScript* y se llevó al termociclador 60 minutos a 50 °C, inactivando 15 segundos a 70 °C.

Se amplificó el ADN mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con kit *Ampli Taq Gold 360 DNA Polymerase* (Applied Biosystems® Life Technologies-ThermoFisherScientific, Massachusetts; EEUU), añadiendo por muestra 5 µl de tampón, 4 µl de MgCl₂, 1 µl de 360GC, 0,5 µl de TaqPolimerasa, 2 µl de dNTPmix, 4 µl de cebador F (*forward*), 4 µl de cebador R (*reverse*), 5 µl de ADNc y agua hasta un volumen final de 50 µl. Seguidamente se llevó al termociclador bajo condiciones:

1. 95 °C durante 10 minutos
2. 95 °C durante 30 segundos
3. X °C (temperatura y tiempo de anillamiento según cebador, Tabla 7)
4. 72 °C durante 60 segundos
5. 34 veces desde punto 2
6. 72 °C durante 10 minutos
7. 20 °C durante 9 horas
8. 20 °C durante 9 horas
9. Fin

Tras finalizar, se guardaron las muestras a - 4 °C hasta su utilización.

GEN	Tª anillamiento	Tiempo	Amplicón		
				<i>Gapdh</i>	5'- GTGTGAACGGATTTGCCCGT
					TTGATGTTAGTGGGGTCTCG - 5'
<i>Gapdh</i>	63 °C	30"	238 pb	<i>Fak</i>	5'- GGAGTTTTTCAGGGTCCGACTG
<i>Fak</i>	60 °C	30"	237 pb		CATTTTCATTATACCTTGTGCAT - 5'

Tabla 7. Condiciones de anillamiento para cada par cebadores empleados en las PCRs de *Gapdh* y *Fak*.

El producto resultante de la PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa, corriendo junto a las muestras un marcador de fragmentos de tamaño conocido (*GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder*, Fermentas-ThermoFisherScientific, Massachusetts; EEUU). Se prepararon los geles de agarosa al 1,7 % en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X en agua ultrapura (MilliQ) con tinción SYBR® Safe (Life Technologies-ThermoFisherScientific) a 10.000X. Se cargó en cada pocillo 10 µl de muestra junto a 4 µl de tampón de carga LB6X (Life Technologies-ThermoFisherScientific). Para cada serie, se cargó en el primer pocillo 6 µl de mezcla del marcador (2 µl de *DNA Ladder*, 1 µl de tampón de carga LB6X y 3 µl de agua ultra pura) y en el último se cargó un control negativo (muestra que no contiene ADN

procedente de la retrotranscripción del ARN extraído del cultivo celular). El gel se corrió en dirección hacia el electrodo positivo, puesto que el ADN está cargado negativamente, a 120 V durante 1 hora y 20 minutos, tras este tiempo se llevó el gel al transiluminador de luz ultravioleta (Molecular Imager Gel DocTM XR+ Imaging System, Bio-Rad Laboratories Inc., California; EEUU) para la obtención de la imagen de las carreras del gel con el *software* de análisis de imagen *Quantity One* (Bio-Rad Laboratorios Inc.).

3.1.3. Diferenciación

Determinación de depósitos de calcio por tinción con Rojo Alizarina

La capacidad del recubrimiento de favorecer la calcificación de la matriz celular fue determinada mediante colorimetría de los depósitos de calcio, utilizando la tinción de Rojo Alizarina (Sigma-Aldrich, Missouri; EEUU) como marcador temprano en las hAMSCs inducidas a diferenciación osteogénica. Este colorante se une al calcio dando lugar a un proceso de quelación que produce un complejo Rojo Alizarina – calcio, produciendo un producto final birrefringente.

Según protocolo de Histocell S.L., tras 16 horas de acondicionamiento de los materiales en medio de crecimiento (DMEM-GlutaMAX) se incubaron las hAMSCs sobre los materiales con una densidad celular de 2.000 células/cm² en un volumen de 1,5 ml de medio de cultivo (DMEM-GlutaMAX suplementado al 10% con FBS). Se incubaron durante 7 días a 37 °C con 5 % CO₂. Transcurridos estos 7 días de cultivo, se indujo la diferenciación osteogénica mediante incubación en medio de diferenciación osteogénico *StemPro Osteoblast Differentiation Medium* (Gibco®-Invitrogen, California; EEUU). Tras 7 y 14 días de cultivo diferenciador, el calcio extracelular producido se analizó mediante tinción de Rojo Alizarina. Para ello, se lavó el cultivo con PBS, se fijaron las células con formaldehído al 10 % y se lavaron de nuevo con PBS. Se procedió a la tinción con Rojo Alizarina al 2 % p/v en agua a pH 4,1 – 4,3 (con NH₄OH al 10 %) durante 15 min en oscuridad y se lavó con agua MilliQ. La extracción de la monocapa celular teñida se realizó con cloruro de cetilpiridinio monohidratado durante 3 horas con agitación. La lectura de absorbancia se obtuvo con un lector de placas (Multiskan Ascent) a λ de 570 nm. La medida de calcio mediante este ensayo proporciona la posibilidad de comparar indirectamente el grado de diferenciación alcanzado entre muestras, ya que sólo los osteoblastos son capaces de mineralizar la matriz extracelular.

Cuantificación de la Fosfatasa Alcalina (ALP)

La enzima Fosfatasa Alcalina (ALP) se encuentra generalmente anclada en la superficie extracelular de la membrana celular, su actividad es un indicador temprano de la diferenciación osteoblástica y juega un papel importante en la mineralización de la matriz extracelular. La función de la ALP es hidrolizar el fósforo orgánico y liberar fósforo inorgánico para la formación de la hidroxiapatita del hueso. Este enzima es indispensable para la formación del hueso, y su secreción o actividad indican la formación de hueso o el inicio de la etapa de diferenciación celular. Bioquímicamente, el ensayo se basa en la medición de la conversión del sustrato P-nitrofenilfosfato (p-NPP) a P-nitrofenol (PNP) como consecuencia de la actividad de la enzima ALP.

Los materiales fueron acondicionados en las mismas condiciones que en el ensayo descrito para el ensayo de ADN y durante el mismo periodo. Tras la siembra de MC3T3-E1 sobre los materiales, con una densidad celular de 18.400 células/cm² y un volumen de 1 ml de DMEM (suplementado con 10 % FBS y 1 % P/S), se dejó en incubación (37 °C con 5 % CO₂) durante 24 horas, tras la cuales se indujo la diferenciación osteogénica mediante 1 % de ácido ascórbico 5 mg/ml (Sigma-Aldrich) y 0,21 % de β-glicerol fosfato 1 M (Fluka, Sigma-Aldrich Group). Al finalizar los periodos de 7 y 14 días de incubación con medio de diferenciación se procedió a la medición de la actividad de la ALP. Primero, se añadieron 100 μl de tampón de lisis (0,2 % Tritón X-100, 10 mM Tris HCl (C₄H₁₁NO₃*ClH) pH 7,2) en frío, dejándolo en hielo durante 7 minutos y posteriormente se sonicó durante 2 minutos. Se centrifugó 7 minutos a 13.000 rpm a 4°C para precipitar los restos celulares. Se añadió al sobrenadante 50 μl de p-nitrofenilfosfato (pNPP; Sigma-Aldrich) a 1 mg/ml en tampón sustrato (glicina: 50 mM, MgCl₂*(H₂O) 6:1 mM, pH 10.5) y se incubó durante 2 horas (37 °C y 5 % CO₂) en oscuridad. Pasado el tiempo se paró la reacción con 50 μl de NaOH 1 M y, tras distribuir las muestras en P96, se efectuó la lectura en lector de placas VictorTM3 a λ de 405 nm. Los resultados se normalizaron frente a la curva patrón realizada a concentraciones de: 0 mM, 0,0001 mM, 0,001 mM, 0,005 mM, 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM y 10 mM de solución stock de p-nitrofenol (p-Nitrophenol Standard Solution, PNP 10 mM, Sigma-Aldrich).

Inmunocitoquímica

Los mismos materiales ensayados para el estudio molecular de la adhesión fueron utilizados en este estudio. Las proteínas estudiadas mediante inmunocitoquímica fueron la osteocalcina (OCN) y la sialoproteína ósea (BSP), así como el factor de transcripción RUNX2. Sobre discos recubiertos con las formulaciones 7M3T, 7M3T+G y 3X y discos de titanio sin recubrir, se realizó la siembra de MC3T3-E1

con una densidad de 18.400 céls/cm² en DMEM suplementado con el 10 % de FBS y 1 % de P/S, y se incubó a 37 °C y 5 % CO₂ durante 24 horas, tras la cuales se indujo la diferenciación osteogénica, mediante adición al medio de ácido ascórbico 5 mg/ml al 1 % y 0,21 % de β-glicerol fosfato 1 M, y se llevó hasta 14 días cambiando el medio cada 48 horas. Al finalizar los periodos de 14 días de incubación con medio de diferenciación, se procedió a retirar el medio de cultivo y se lavó 3 veces con DPBS⁺⁺ para eliminar cualquier resto antes de fijar las células con formalina al 4 % durante una hora a 4 °C. Se retiró el fijador mediante 3 lavados con DPBS⁺⁺ y se procedió a la realización de la inmunocitoquímica. Primero, se permeabilizaron las membranas 5 minutos a temperatura ambiente con Tritón 0,5 % en tampón fosfato salino (siglas en inglés PBS), tras lo cual se lavaron 2 veces las muestras con DPBS⁺⁺. Se bloqueó con BSA al 1 % en DPBS⁺⁺ durante 30 minutos a temperatura ambiente y se añadió el anticuerpo primario correspondiente a cada caso en BSA al 1 % en DPBS⁺⁺, incubándose durante 1 hora a 37 °C y 5 % CO₂ en oscuridad. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-osteocalcina (dilución 1:200, Abcam), anti-sialoproteína ósea (dilución 1:200, Santa Cruz), anti-RUNX2 (dilución 1:50, Abcam). Eliminamos el anticuerpo primario y lavamos 3 veces con Tween 20 al 0,5 % en DPBS⁺⁺. Añadimos el anticuerpo secundario correspondiente a cada primario; *antimouse* Alexa Fluor 488 (dilución 1:100, Invitrogen), *antirabbit* Alexa Fluor 488 (dilución 1:100, Invitrogen), en BSA al 1 % en DPBS⁺⁺, e incubamos durante 1 hora a 37 °C y 5 % CO₂. Repetimos el paso de lavado, esta vez del anticuerpo secundario. Se montaron las muestras sobre los portaobjetos, añadiendo una gota de medio de montaje con DAPI antes de colocar el cubreobjetos (Vectashield®) para observar los núcleos, a excepción de las muestras de RUNX2 que fueron montadas con medio sin DAPI (FluorSave™ Reagent, CALBIOCHEM-EMD Millipore) puesto que el DAPI enmascara la señal de la proteína nuclear.

Expresión génica (RT-PCR)

Como se ha dicho anteriormente, RUNX2 es un factor de transcripción implicado en la diferenciación temprana de los osteoblastos, por su importancia, se realizó un estudio de su expresión tras 3 horas y tras 14 días de su siembra (con medio de diferenciación). Además de la expresión de Runx2, también se evaluó la expresión de otros genes involucrados en el proceso de diferenciación de osteoblastos como son la osteocalcina (Ocn) y la de sialoproteína ósea (Bsp).

Sobre discos recubiertos con las formulaciones 7M3T, 7M3T+G y 3X y discos de titanio sin recubrir, se realizó la siembra de MC3T3-E1 con una densidad de 18.400 céls/cm² en DMEM suplementado con el 10% de FBS y 1% de P/S, y se incubó a 37 °C y

5% CO₂ durante 24 horas, tras la cuales se indujo la diferenciación osteogénica, mediante 1% de ácido ascórbico 5 mg/ml y 0,21% β-glicerol fosfato 1 M, y se llevó hasta 14 días cambiando el medio cada 48 horas.

Tras este periodo de tiempo, se procedió a extraer el ARN con el kit comercial *RNeasy® Micro Kit*, obteniendo finalmente unos 12 µl de extracto, utilizando 1 µl para medir mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000c/2000 UV-Vis) la concentración de ARN extraído (ng/µl) para cada muestra.

Para la retrotranscripción, con el kit *SuperScript III RT*, se utilizaron 0,8 µg de ARN, 1 µl de oligo dT₍₁₂₋₁₈₎, 1 µl de dNTPs 10 mM y agua libre de ARNsas hasta un volumen final de 13 µl, que se llevaron 5 minutos a 65 °C en termociclador (MJMini™ Personal Thermal Cycler). Tras enfriar un minuto en hielo se añadieron 4 µl de tampón *First Strand 5X*, 1 µl de 0,1 M de ditioneitol (DTT) y 2 µl de *SuperScript*, y se llevó al termociclador 60 minutos a 50 °C, inactivando 15 segundos a 70 °C.

Se amplificó el ADN mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con kit *Ampli Taq Gold 360 DNA Polymerase*, añadiendo por muestra 5 µl de tampón, 4 µl de MgCl₂, 1 µl de 360GC, 0,5 µl de TaqPolimerasa, 2 µl de dNTPmix, 4 µl de cebador F (*forward*), 4 µl de cebador R (*reverse*), 5 µl de ADNc y agua hasta un volumen final de 50 µl. Seguidamente se llevó al termociclador bajo condiciones:

1. 95 °C durante 10 minutos
2. 95 °C durante 30 segundos
3. X °C (temperatura y tiempo de anillamiento según cebador, Tabla 8)
4. 72 °C durante 60 segundos
5. 34 veces desde el punto 2
6. 72 °C durante 10 minutos
7. 20 °C durante 9 horas
8. 20 °C durante 9 horas
9. Fin

Tras finalizar, se guardaron las muestras a - 4 °C hasta su utilización.

GEN	Tª anillamiento	Tiempo	Amplicón		
<i>Gapdh</i>	63 °C	30"	238 pb	<i>Gapdh</i>	5'- GTGTGAACGGATTGGCCGT
					TTGATGTTAGTGGGGTCTCG - 5'
<i>Runx2</i>	61 °C	30"	650 pb	<i>Runx2</i>	5'- GTGCTCTAACACAGTCCATGCAG
					- 5'
<i>Ocn</i>	59 °C	60"	360 pb	<i>Ocn</i>	5'- CTCTGTCTCTGACCTCACAG
					GGAGCTGTGTGACATCCATAC - 5'
<i>Bsp</i>	60 °C	60"	383 pb	<i>Bsp</i>	5'- CTCGGGTGTAACAGCTAGCTAC
					CGTTCAGAAGGACAGTGTCTG - 5'

Tabla 8. Condiciones de anillamiento para cada par cebadores empleados en las PCRs de; gliceraldehído 3 fosfato-deshidrogenasa (Gapdh), factor de transcripción 2 relacionado con Runt (Runx2), osteocalcina (Ocn) y sialoproteína ósea (Bsp).

El producto resultante de la RT-PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa, corriendo junto a las muestras un marcador de fragmentos de tamaño conocidos (*GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder*). Se prepararon los geles de agarosa al 1,7 % en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 1X en agua ultrapura (MilliQ) con tinción SYBR® Safe a 10.000X. Se cargó en cada pocillo 10 µl de muestra junto a 4 µl de tampón de carga LB6X. Para cada serie se cargó en el primer pocillo 6 µl de mezcla del marcador (2 µl de *DNA Ladder*, 1 µl de tampón de carga LB6X y 3 µl de agua ultra pura) y en el último se cargó un control negativo (muestra que no contiene ADN procedente de la retrotranscripción del ARN extraído del cultivo celular). El gel se corrió en dirección hacia el electrodo positivo, puesto que el ADN está cargado negativamente, a 120 V durante 1 hora y 20 minutos, tras este tiempo se llevó el gel al transiluminador de luz ultravioleta para la obtención de la imagen de las carreras del gel con el *software* de análisis de imagen *Quantity One*.

3.1.4. Tratamiento de datos

Con los datos facilitados por Histocell S.L. de los ensayos de proliferación por MTT y de detección de depósitos de calcio por Rojo Alizarina con hAMSCs, se realizó el estudio estadístico que se mostrará en el apartado de resultados de este trabajo.

Del ensayo de citotoxicidad por MTS se obtuvieron las lecturas de absorbancia para el formazán, de color azul, en el lector de placas, valores directamente proporcionales al número de células viables a cada uno de los periodos. A las muestras cultivadas con células en extracto se les restaron los valores de los correspondientes blancos y el resultado se expresó como el porcentaje de *Viabilidad celular* en extracto, respecto a la media para la viabilidad de los controles negativos.

$$Viabilidad\ celular = \left[\frac{D.O.\ muestra\ con\ células - D.O.\ blanco}{D.O.\ control\ negativo} \right] \times 100$$

La reducción superior al 30 % de la viabilidad celular se consideró un efecto citotóxico, tal y como se describe en la ISO 10993-5:2009 [170].

Del ensayo de adhesión y de proliferación, se obtuvieron las lecturas de fluorescencia, de las muestras y de los patrones de concentración conocida, de ácidos nucleicos de ADN de doble cadena en la disolución. Se calculó la pendiente para la recta de regresión de la curva patrón y se ajustaron a la recta los valores obtenidos de

la diferencia de las lecturas de muestras con células y los blancos (cultivo de muestras sin células en igualdad de condiciones). De estos cálculos se obtuvieron los valores de ADN total (μg). Para la determinación de la proliferación celular real, los datos del ensayo de proliferación se expresaron en relación a la cuantificación de ADN inicial, es decir a la detectada en el ensayo de adhesión, de la manera que sigue:

$$\text{Proliferación real} = \frac{\text{Proliferación}}{\text{Adhesión}} = \frac{(\mu\text{gADN})}{(\mu\text{gADN})}$$

Para cuantificación de la ALP, en el ensayo de diferenciación, se obtuvieron las lecturas de absorbancia de las muestras y de los patrones de concentración conocida del p-nitrofenol (PNP) en la disolución. Se calculó la pendiente para la recta de regresión de la curva patrón y se ajustaron a la recta los valores obtenidos de la diferencia de las lecturas de muestras con células y los blancos (cultivo de muestras sin células en igualdad de condiciones). De estos cálculos se obtuvieron los valores de PNP (mM/h). Para la medida de actividad de ALP como indicador de diferenciación osteoblástica, los datos obtenidos de actividad de ALP se expresaron en relación a la cantidad de ADN total, de la manera que sigue:

$$\text{Diferenciación} = \frac{\text{Actividad de ALP}}{\text{Proliferación}} = \frac{(\text{mMPNP/h})}{(\mu\text{gADN})}$$

Las variables para la realización del estudio estadístico, para los ensayos con hAMSCs, fueron:

- *Proliferación*, determinada como la viabilidad celular tras cultivo de 0 horas, 1, 7 y 14 días, expresada como D.O.

- *Mineralización*, determinada indirectamente por calcificación de la matriz extracelular, expresada como D.O.

- *Viabilidad celular*, determinada como supervivencia celular tras cultivo (24 horas) en extracto del material a evaluar, respecto a la supervivencia celular en el mismo periodo de cultivo sin extracto, expresada como D.O.

Las variables para la realización del estudio estadístico, para los ensayos con MC3T3-E1, fueron:

- *Viabilidad celular*, determinada como supervivencia celular tras cultivo (24 horas) en extracto del material a evaluar, respecto a la supervivencia celular en el mismo periodo de cultivo sin extracto, expresada como D.O.

- *Proliferación*, determinada como la cantidad de ADN (μg) obtenido en el ensayo de proliferación a cada uno de los periodos de estudio (1, 7 y 14 días), respecto de la cantidad de ADN (μg) obtenido en el ensayo de adhesión a 12 horas.

- *Diferenciación*, determinada como actividad de ALP (mM PNP/h) del ensayo a cada uno de los periodos de estudio (7 y 14 días), respecto a la cantidad total de ADN (μg), obtenida del ensayo de proliferación a los periodos de estudio correspondientes.

La significación de los resultados fue determinada empleando el programa estadístico SPSS 17.0 ($p < 0,05$). Para la comparación de medias de más de dos muestras se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y para la comparación de medias de dos muestras se empleó un Test T-Student, ambos test se realizaron siempre y cuando el Test de Levene determinara la homogeneidad de la varianza. Para los conjuntos de datos en los que no se cumplió la homocedasticidad, se realizó un Test no paramétrico de Kruskal Wallis de k muestras independientes. Las tablas resultado del estudio estadístico se muestran en el **ANEXO 1** para la **Fase de Caracterización I** y en el **ANEXO 2** para la **Fase de Caracterización II**.

3.1.5. Morfología celular

Tras cultivo de 7 y 14 días, en condiciones de cultivo idénticas a las descritas anteriormente para el ensayo de cuantificación de la adhesión y proliferación celulares, se procedió a la observación de la morfología celular de MC3T3-E1 sobre las distintas superficies de 7M3T, 7M3T+G y 3X, mediante microscopio electrónico de barrido (SEM) JSM 5410 (JEOL Ltd., Tokio; Japón) a 20 kV, con baño de carbono. De cada muestra se tomaron imágenes panorámicas a 200X y detalle celular a 500X.

Para su observación al SEM, las muestras se fijaron con glutaraldehído al 4 % (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 4 °C y se post-fijaron con tetraóxido de osmio al 4 % en PBS 0,1 M (Aname, Madrid; España) a temperatura ambiente y oscuridad durante 2 horas. Se procedió a la deshidratación, a 4 °C, de las muestras con alcoholes de gradación creciente hasta absoluto y a la posterior desecación por punto crítico. La desecación por punto crítico es necesaria para mantener la estructura celular, ya que el líquido presente en la muestra pasa a fase gaseosa sin pasar por el límite de fases "líquido-gas" y la muestra se seca sin los efectos dañinos del secado en aire producidos por los cambios en la tensión superficial. En el desecado por punto crítico, las muestras se dispusieron en unas cestas con etanol absoluto, se bajó la temperatura por debajo de 10°C añadiéndole CO₂ líquido que va desplazando al etanol. Seguidamente, se lleva la muestra al punto crítico del CO₂, 31 °C y 74 bar, alcanzadas estas condiciones se elimina el gas de la cámara y la muestra queda desecada [230].

3.2. Evaluación biológica tras la implantación *in vivo*

3.2.1. Implantación *in vivo*

Con el objetivo de evaluar la biocompatibilidad, la capacidad de osteointegración y degradación *in vivo* de los nuevos recubrimientos sol-gel desarrollados, se utilizó el modelo de osteointegración de prótesis radicular en tibia de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) Nueva Zelanda blanco. La implantación de la **Fase de Caracterización I** tuvo lugar en el animalario de la Universidad de Murcia (REGAES 300305440012), la perteneciente a la **Fase de Caracterización II** tuvo lugar en el estabulario del Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV) (ES 46 250 00010006). Ambos estudios experimentales cumplieron las condiciones éticas y legales establecidas en el R.D. 223/1988 de 14 de marzo y la Orden de 13 de octubre de 1988 sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Ambos estudios fueron revisados y aprobados por los Comités de Ética de Bienestar Animal correspondientes (Universidad de Murcia y Universidad Politécnica de Valencia).

En la Tabla 9 se muestra las formulaciones con las que fueron recubiertas, las prótesis radiculares de conexión interna de titanio CP grado 4 GMI® modelo Frontier de 3,75 mm de diámetro por 8 mm de longitud, con tratamiento superficial ADS®, que le otorga una rugosidad heterogénea al combinar un microbulado de corindón blanco con un ataque ácido.

Figura 31. Ejemplo de sistema de codificación de muestras empleado en las fases *in vivo*.

Cirugía

Aunque el procesado de las muestras fue el mismo y fue realizado por el mismo personal en las distintas fases, tanto los diseños experimentales, como los equipos de profesionales y los procedimientos quirúrgicos fueron diferentes, es por ello que se detallan a continuación.

En este estudio se escogió el modelo de osteointegración de implantes dentales en tibia de conejo ampliamente descrito en bibliografía [172, 192, 196, 197, 198, 199, 200, 231, 232]. En bibliografía podemos encontrar descritos tiempos de entre 4 y 6 semanas para la completa osteointegración de implantes de titanio en animales de experimentación [48]. Es por ello que en este estudio, como aproximación a un modelo de implantación maxilar, se decidió implantar en tibia proximal durante periodos de implantación que aseguraran observar una diferencia entre los materiales y el control [233]. Como se indicó en la introducción, la facilidad de estabulación, manejo, mantenimiento y coste, además de un tamaño no demasiado pequeño, hacen del conejo un adecuado modelo animal de experimentación como aproximación inicial, previa a una fase experimental en modelo animal superior (perro), para la evaluación de la biocompatibilidad y capacidad de osteointegración de implantes dentales.

Fase de Caracterización I

En esta fase experimental fueron utilizados un total de veinte conejos de entre 2.000 y 3.000 g de peso, correspondiente a edades próximas al cierre fisario, indicativo de un volumen óseo adecuado para el estudio, y de ambos sexos. Se implantaron dos prótesis radiculares por tibia, interviniéndose ambas patas, por lo que un total de ochenta prótesis fueron necesarias. Este primer estudio constó de cuatro periodos distintos de implantación de 1, 2, 4 y 8 semanas, ya que, según bibliografía, un implante en conejo tarda entre 4 y 6 semanas en osteointegrar completamente [48]. Con estos periodos de estudio cubrimos todas las fases del proceso hasta asegurar su completa finalización a las 8 semanas. En la tabla de la Figura 32 se indican los diferentes materiales ensayados en esta experimentación por cada periodo de ensayo y su disposición en tibia en las imágenes de la Figura 32. El número de réplicas para cada material y periodo de evaluación fue de cinco, tres de las cuales sirvieron para el estudio de biocompatibilidad y osteointegración (mediante microscopía óptica), mientras que las otras dos se emplearon para evaluar (mediante microscopía electrónica de barrido, SEM) la degradación del recubrimiento y la liberación de silicio a la matriz extracelular.

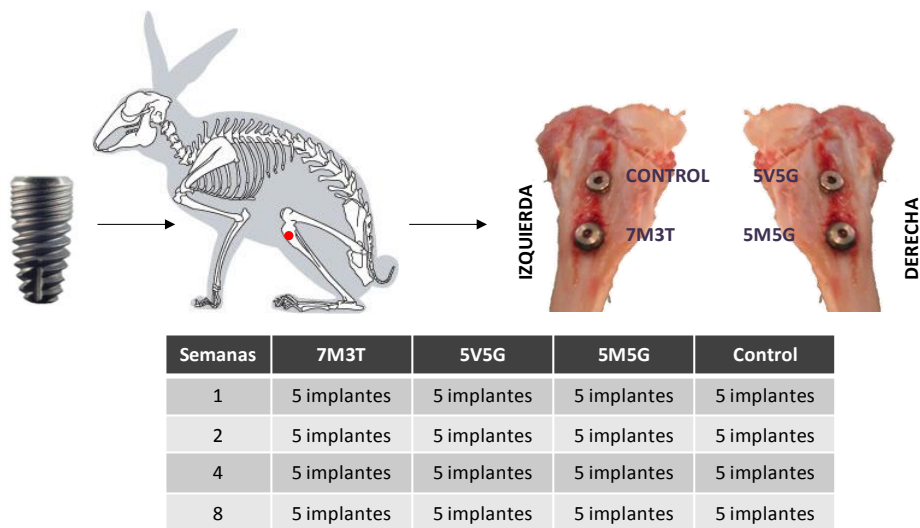


Figura 32. Diseño experimental del modelo de osteointegración de implantes dentales en tibia de conejo empleado en la **Fase de Caracterización I**.

Los animales se sedaron mediante administración intramuscular (IM) de hidroclocloruro de clpromazina (10 mg/kg). Se les administró profilaxis antibiótica (amoxicilina) y se les preparó para la intervención. En quirófano se procedió a la inducción anestésica mediante inyección IM de clorhidrato de ketamina 50 mg/kg (Imalgene®, Merial, Georgia, EEUU), la pauta de mantenimiento fue “a demanda” mediante la administración de 20 mg/kg, vía IM ante el menor signo de agitación del animal. Se preparó el campo quirúrgico.

Al ser intervenido el animal de las dos patas, se eligió la zona proximal antero-interna de la tibia para colocar el implante, ya que esta vía de abordaje es poco traumática y sangrante. Tras la incisión cutánea de 15 mm se desperiostizó la tibia y se marcó con una punta de grafito la zona de implantación. Seguidamente se realizó el defecto óseo mediante fresado sucesivo (de 2,0 mm, 2,8 mm y 3,2 mm de diámetro), con micromotor de bajas revoluciones e irrigación continua de suero fisiológico. Tras lavar, se implantaron las prótesis radiculares mediante *press-fit* (colocación mediante presión con la mano). En cada pata de un mismo animal se implantaron dos prótesis radiculares de la forma en que se puede observar en la Figura 32 (imagen derecha).

Se procedió al cierre de la herida por planos. Tras transcurrir los distintos periodos de ensayo, los animales fueron eutanasiados mediante inhalación de monóxido de carbono. Tras comprobar la ausencia de signos vitales, la región proximal de la tibia se limpió de tejidos blandos y se realizó una osteotomía de disección, con mini sierra circular, a distancia de 5 mm a ambos lados del implante (Figura 33). Las

secciones tibiales con el implante de titanio fueron cedidas para ser procesadas en la Universidad Jaume I para su estudio en microscopía óptica y SEM.



Figura 33. Sección tibial con prótesis radicular implantada en tibia de conejo, obtenida por osteotomía tras sacrificio.

Las muestras fueron codificadas con tres números y una letra. El primer número fue un 1 para indicar su pertenencia a la primera fase implantación, el segundo 1, 2, 4 u 8 correspondientes al periodo de implantación, y el tercer número, del 1 al 5, referente al número de réplica. La letra adjunta al código numérico indicó el tipo de recubrimiento aplicado; la letra A correspondiente al recubrimiento de formulación 7M3T, la letra B asignada a 5V5G, la C asignada al recubrimiento de formulación 5M5G y los implantes sin recubrir utilizados como control en el estudio, fueron asignados con la letra O. A continuación se muestra la Tabla 10 con todas las muestras implantadas:

Semanas	7M3T	5V5G	5M5G	Control
1	111A, 112A, 113A, 114A, 115A	111B, 1112B, 113B, 114B, 115B	111C, 112C, 113C, 114C, 115C	111O, 112O, 113O, 114O, 115O
2	121A, 122A, 123A, 124A, 125A	121B, 122B, 123B, 124B, 125B	121C, 122C, 123C, 124C, 125C	121O, 122O, 123O, 124O, 125O
4	141A, 142A, 143A, 144A, 145A	141B, 142B, 143B, 144B, 145B	141C, 142C, 143C, 144C, 145C	141O, 142O, 143O, 144O, 145O
8	181A, 182A, 183A, 184A, 185A	181B, 182B, 183B, 184B, 185B	181C, 182C, 183C, 184C, 185C	181O, 182O, 183O, 184O, 185O

Tabla 10. Códigos de todas las muestras implantadas en la **Fase de Caracterización I**.

Fase de Caracterización II

En la segunda fase experimental realizada en el IBV, fueron utilizados un total de veintiséis conejos jóvenes adultos de 18 semanas de edad, hembras nulíparas, de entre 3.000 y 3.500 g de peso. Se implantó sólo una prótesis radicular por tibia, interviniéndose ambas patas, un total de cuarenta y dos prótesis fueron necesarias. Debido a los resultados obtenidos de la fase anterior, se decidió que el nuevo diseño experimental contara sólo con los dos periodos de estudio más cortos, 1 y 2 semanas, puesto que las mayores diferencias entre materiales y con el control residieron en estos dos periodos. En la Tabla 11 se indican los diferentes materiales ensayados en esta experimentación por cada periodo de ensayo, en ella se muestra la formulación triple con gelatina (3X+G) de la que no se tratará en esta Tesis. El número de réplicas

para cada material y periodo esta vez fue de cuatro, todas destinadas al estudio histológico mediante microscopía electrónica. En esta experimentación no se evaluaron muestras mediante SEM puesto que el valor de esta información no superaba el esfuerzo y la inversión requeridos, que se invirtieron en otras técnicas.

Semanas	7M3T	7M3T+G	3X	3X+G	Control
1	4 implantes	4 implantes	4 implantes	4 implantes	4 implantes
2	4 implantes	4 implantes	5 implantes	4 implantes	5 implantes

Tabla 11. Diseño de experiencias de la Fase II de Caracterización.

Los animales fueron suministrados en cajas de transporte individuales por Isoquimen S.L. (Barcelona; España), una empresa, autorizada por el Gobierno de España que sigue las recomendaciones de la Federación de las Ciencias del Animal de Laboratorio (FELASA, del inglés *Federation for Laboratory Animal Science*), suministradora de animales para fines científicos. Tras la recepción de los animales, se les sometió a un examen rutinario, comprobando la ausencia de signos evidentes de (*Pasteurella*, quistes, mal de patas, sarna, diarrea, etc.). Los animales fueron estabulados individualmente bajo condiciones de ciclo luz/oscuridad de 12 horas, a temperatura de $20,5 \pm 0,5$ °C y humedad relativa 45 – 65 %. Los animales fueron alimentados con 150 g de pienso para adultos (NANTA S.A., Madrid; España) cada 2 días y agua filtrada *ad libitum*.

Tras el periodo de cuarentena de dos semanas, comenzó el periodo de intervenciones. Los animales fueron trasladados a la zona preoperatoria donde se pesaron. El protocolo preanestésico consistió en la administración, vía IM en los músculos semitendinosos o semimembranosos de las extremidades posteriores, de una mezcla formada por 2,5 mg/kg de xilacina (Rompun® 2 %, Bayer Hispania S.L., Barcelona; España) y 17,5 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Imalgene®, Merial, Georgia; EEUU).

Como profilaxis antibiótica se administró 3,5 mg/kg de enrofloxacino (Baytril® 2,5 %, Bayer Healthcare AG, Leverkusen; Alemania) vía IM.

Como analgésico se administró, intramuscularmente, una dosis de 0,4 mg/kg de butorfanol tartrato (Torbugesic® 10 mg/ml, Fort Dodge Veterinaria S.A., Gerona; España) como analgésico preoperatorio.

Tras 10 minutos, al animal ya dormido se le indujo la anestesia mediante una dosis intravenosa (IV) de 3 mg/kg de propofol-lipuro 1 % (Propofol®, B. Braun Medical S.A., Melsungen; Alemania) en vena auricular marginal. Para el mantenimiento

anestésico se administró Propofol® de forma continua mediante una bomba de perfusión. La dosis fue de 21 mg/kg/h.

El tiempo de espera anestésico fue de 10 – 15 minutos, tiempo durante el cual se procedió a depilar la pata a intervenir con una esquiladora para perros (Olster, Sunbeam Corporation, Florida; EEUU). Se cubrió la parte no rasurada hasta las uñas con una venda autoadhesiva (Askina®, B. Braun Medical S.A., Melsungen; Alemania) y la piel expuesta se limpió con agua y jabón neutro, seguido de una solución antiséptica de povidona yodada al 10 %. Se colocaron los paños estériles y se preparó el campo quirúrgico.

Se realizó una incisión, en la cara medial de la tibia, de 20 mm desde el extremo distal de la tuberosidad tibial. Se disecó el tejido subcutáneo, se seccionó la fascia muscular, se rebatió el músculo flexor largo común de los dedos, se expuso la zona de perforación y se desperiostizó. La perforación se realizó según protocolo de inserción de las prótesis GMI® modelo Frontier recomendado por Ilerimplant S.L., igual que se realizaría en una intervención convencional en clínica. Para ello se utilizaron varios kits quirúrgicos esterilizables GMI® Frontier y un micromotor de bajas revoluciones con irrigación continua automática de suero fisiológico (ambos cedidos por Ilerimplant S.L.). La secuencia de fresado, mostrada en la Figura 34, comenzó con el marcaje de una pequeña señal hecha a mano con la fresa lanceolada. Después se procedió a la primera perforación con la misma fresa, después se utilizó una fresa piloto y tras ésta una fresa guía, que permite que la serie siguiente de fresas de diámetro creciente (de 2,8 mm, 3,0 mm y 3,5 mm) entren perpendiculares a la cortical. Finalmente, la avellanadora permitió dar al defecto la forma necesaria para alojar el implante.

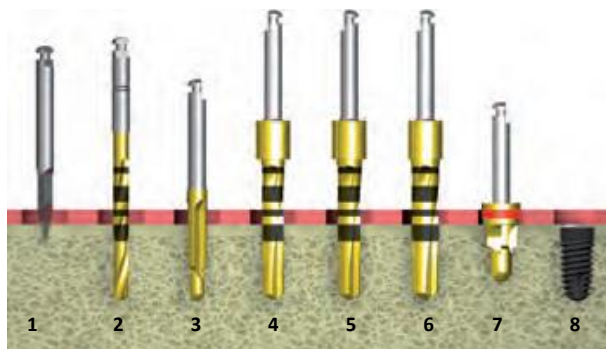


Figura 34. Secuencia de fresado para la implantación de prótesis radiculares en tibia de conejo de la **Fase de Caracterización II**; (1) fresa lanceolada, (2) fresa piloto, (3) fresa guía, (4) fresa de \varnothing 2,8 mm, (5) fresa \varnothing 3,0 mm, (6) fresa \varnothing 3,5 mm, (7) avellanadora e (8) implante.

Una vez creado el defecto, se procedió a implantar la prótesis mediante el procedimiento que se muestra en la Figura 35. Las prótesis GMI® modelo Frontier

constan de un doble envase, siendo el envase secundario de plástico técnico y el envase primario de vidrio Pyrex®. El envase primario, contiene un soporte de titanio donde se aloja únicamente el implante dental preparado para ser introducido directamente en boca, utilizando una única llave transportador, diseñada a tal efecto. Fueron insertados manualmente con la llave de carraca dinamométrica, aplicando un par de apriete entre 35 – 40 N*cm y un máximo de 60 N*cm. En el cierre del envase primario se encuentra el tapón de cierre de la prótesis que, como ésta, también se colocó utilizando una llave transportadora diseñada a tal efecto.



Figura 35. Pasos a realizar para la extracción de la prótesis del empaquetado individual estéril, implantación y roscado en tibia de conejo; (1) desenroscado de la tapa del envase secundario de plástico, (2) extracción del envase primario de vidrio, (3) retirada de la tapa del envase primario, (4) extracción de la prótesis con llave transportadora, (5) implantación en hueso con llave de carraca dinamométrica, (6) extracción del tapón de la prótesis de la tapa del envase primario mediante (7) llave transportadora y (8) enroscado del tapón en la parte superior de la prótesis.

Una vez puesto el implante, se procedió al cierre de la herida suturando por planos con sutura reabsorbible Vicryl® 4/0 (Ethicon, Somerville; EEUU), para los puntos internos se utilizaron puntos simples, la piel se cerró mediante sutura intradérmica para evitar que los animales pudieran morderse los puntos y abrirse la herida. Una vez suturados, se les retiró la anestesia y se les administró como antiinflamatorio flunixin meglumina (Finadyne® 50 mg/ml, Schering-Plough. S.A., Madrid; España). La dosis a administrar, vía subcutánea, fue de de 1 mg/kg.

Tras los primeros signos de despertar, los animales fueron trasladados a sus jaulas donde acabaron de salir de la fase de anestesia de una forma suave y progresiva. Los animales permanecieron monitorizados cada ocho horas durante los tres días siguientes a la intervención para comprobar la evolución del hematoma y vigilar que no existiera infección. El procedimiento antibiótico y analgésico se mantuvo durante tres días, administrando una dosis diaria de 3,5 mg/kg de Baytril® y una dosis diaria de Torbugesic® de 0,4 mg/kg, ambas intramuscularmente.

Veintiún animales fueron finalmente intervenidos, ya que uno de ellos fue sacrificado antes de finalizar el periodo de estudio, repitiendo la implantación, debido a que durante el postoperatorio el animal mostró signos de cojera y autofagia en una de las patas.

Tras el cumplimiento de los periodos de estudio de 1 y 2 semanas, se procedió a eutanasiar a los animales mediante inyección IV, en la vena marginal auricular, de una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vetoquinol S.A., Madrid; España). Los animales fueron previamente sedados mediante mezcla de Imalgene® y Rompun® a dosis quirúrgicas. Tras comprobar la ausencia de signos vitales, se accedió a la región proximal de la tibia y se realizó una osteotomía de disección, con una sierra oscilante, a una distancia de 5 mm a ambos lados del implante. Los cadáveres fueron almacenados en un armario congelador a -25 °C hasta su recogida por parte de la empresa autorizada para la eliminación de animales de experimentación (Gesmer Logistics Mer S. A., Valencia; España).

Las muestras fueron codificadas siguiendo el mismo criterio que en la fase anteriormente descrita Tabla 12. El primer número fue un 4, ya que esta fase experimental descrita correspondió a una cuarta tanda quirúrgica de implantación. Las tandas 2 y 3, intermedias entre las fases experimentales descritas, no se incluyen en esta Tesis. El segundo número indicó el periodo de estudio de 1 o 2 semanas. El tercer número se asignó en referencia al número de repetición correspondiente entre 1 y 4. Seguidamente los materiales se designaron mediante las siglas C, correspondiente al control, M correspondiente al recubrimiento de formulación 7M3T y T para la formulación 3X, añadiendo una G al final para indicar si la formulación contenía el 0,9 % de gelatina, siendo por tanto MG para designar a la formulación 7M3T con 0,9 % de gelatina (7M3T+G), y TG a la formulación 3X con 0,9 % de gelatina (3X+G).

Semanas	7M3T	7M3T+G	3X	3X+G	Control
1	411M, 412M, 413M, 414M	411MG, 412MG, 413MG, 414MG	411T, 412T, 413T, 414T	411TG, 412TG, 4123TG, 414TG	411C, 412C, 413C, 414C
2	421M, 422M, 423M, 424M	421MG, 422MG, 423MG, 424MG	421T, 422T, 423T, 424T, 425T	421TG, 422TG, 423TG, 424TG	421C, 422C, 423C, 424C, 425C

Tabla 12. Códigos de todas las muestras implantadas en la **Fase de Caracterización II**.

Estudio histológico

Tras obtener las muestras, éstas fueron inmediatamente fijadas, sumergiéndolas en etanol 40 % a 4 °C. El procesado histológico de inclusión en metacrilato se realizó según protocolo publicado por Peris en 1993 para muestras óseas sin descalcificar. La utilización de muestras óseas calcificadas permite mantener intacta la fase mineral del hueso y permite la tinción específica de las líneas cementantes y del osteoide [202]. Por ello la inclusión debe realizarse en metacrilato, que aporta una rigidez similar al hueso para que pueda ser cortado sin romperse la interfaz. Hay que añadir que, en este estudio contamos con un implante metálico el cual solamente puede ser cortado, para su visualización en el microscopio óptico, mediante el sistema de corte de doble

banda y micropulido EXAKT® (EXAKT® Vertriebs, Norderstedt; Alemania), lo cual también requiere de un material duro de soporte. La revisión de la literatura consultada indica que, diversos autores se han declinado por diferentes tipos de metacrilatos. Sin embargo, en la actualidad son muchos los autores que prefieren utilizar el metil-metacrilato (MMA) como medio de infiltración e inclusión, ya que presenta dos claras ventajas frente a las otras alternativas, la primera de ellas es su capacidad de infiltración de muestras de gran tamaño previamente tratadas y la segunda es la versatilidad de tinción [202].

Tras el primer paso de fijación de las muestras en etanol de 40 % a 4 °C, las muestras fueron deshidratadas mediante alcoholes de gradación creciente hasta acabar el proceso mediante inmersión en xileno (Sigma-Aldrich) a vacío (22 mm Hg), y temperatura de 4 °C. La infiltración consiste en sumergir las muestras en soluciones de MMA (monómero; Sigma-Aldrich), dibutil-ftalato (plastificador; Sigma-Aldrich) y tres concentraciones crecientes (solución I, II y III) de peróxido de benzoílo (iniciador; Sigma-Aldrich) hasta una solución final idéntica a la solución de polimerización (solución III) [202]. Las muestras permanecieron 3 días en la solución I, 4 días en la solución II y 6 días en la solución III de infiltración en condiciones de vacío (22 mm Hg) y 4 °C. La polimerización de las muestras se realizó en dos etapas. En primer lugar, se polimerizó una capa de 5 ml de solución III en el fondo de un vial de vidrio de boca ancha de 30 ml, primero tapado herméticamente y a temperatura ambiente durante una noche y después en un baño termostataado de agua a 38 °C durante 3 días. Una vez polimerizado el lecho, se procedió a colocar la muestra ya infiltrada sobre él. Tras orientar adecuadamente la muestra se rellenó el vial con 25 ml de nueva solución III. Tal y como se hiciera en la primera etapa, se cerró y se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche, tras lo cual permaneció hasta su polimerización en el baño a 38 °C. Los códigos de las muestras se mantuvieron en las tapas de los viales escritas con líquido corrector de escritura (Tipp-Ex; Tipp-Ex GmbH & Co. KG, Frankfurt; Alemania), resistente a vapores de polimerización y a vapor de agua (Figura 36).



Figura 36. Proceso de inclusión de muestras óseas sin descalcificar en metil-metacrilato (MMA); polimerización a baño maría con codificación resistente al agua (arriba izquierda), viales con muestra polimerizada y con lecho polimerizado (arriba derecha), visión frontal de una sección transversal de tibia de conejo con implante dental polimerizada y correctamente codificada (abajo izquierda) y visión lateral de una muestra donde se puede observar la parte superior de la prótesis radicular implantada en tibia de conejo (abajo derecha).

Una vez polimerizados los viales, se rompieron para obtener los bloques de MMA con las muestras, se codificaron con un rotulador de vidrio (Lumocolor® permanent, Staedtler, Núremberg; Alemania) y se enviaron al Instituto de Cerámica de Galicia (ICG) donde las muestras fueron cortadas mediante el sistema EXAKT®, montadas en portas y teñidas. El procesado de las muestras para su corte mediante sistema de doble banda y micropulido consta de una serie de etapas de preparación de la muestra que se resumen en la Figura 37.

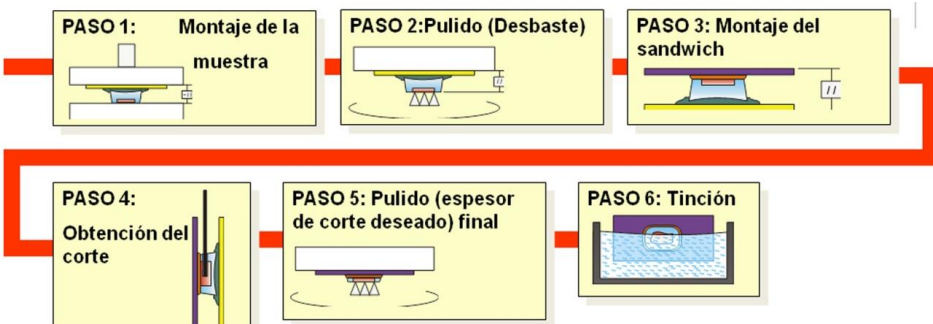


Figura 37. Esquema del procesado de las muestras incluidas en MMA para su corte para microscopía óptica mediante Sistema EXAKT®. (Imágenes obtenidas de Guillermo Vallespí, Leica Microsystems).

Para preparar los extremos de los bloques cilíndricos y conseguir orientar el eje longitudinal de la prótesis implantada en el hueso, se utilizó una sierra con cuchilla de diamante (ACCUTOM-2) a una velocidad de desplazamiento de 0,8 – 1,0 mm/min y 2.800 rpm. El bloque con la muestra orientada se pegó en un portaobjetos de vidrio, puliendo la cara libre para conseguir dejarla totalmente paralela al portaobjetos. Se pegó otro portaobjetos en la superficie recién pulida, obteniendo el montaje en sándwich, a partir del cual se consiguió un corte justo por el eje longitudinal del implante, obteniendo las dos mitades de la muestra. Una mitad se preservó mediante cobertura con resina, para futuras evaluaciones. La otra mitad se pulió hasta conseguir el mínimo espesor posible que garantice su correcta visualización en el microscopio óptico. Se consiguió un espesor de 30 μm (que permite enfoques precisos a microscopía óptica de hasta 20X e incluso a 40X), limitado por el implante metálico.

El protocolo de tinción comenzó con la desplastificación de las secciones para eliminar el MMA mediante 3 baños de 25 minutos de Cellosolve (etilén-glicol-monoetil-éter; Sigma-Aldrich). A continuación se rehidrataron las muestras en series de alcohol decreciente, quedando preparados los cortes para su tinción por la técnica del Tricrómico de Gomori, según protocolo descrito por García, en el que por 100 ml de agua destilada se añaden 0,6 g de cromotropo 2R, 0,3 g de verde luz, 0,7 g de ácido fototúngstico y 1 ml de ácido acético (glacial) [234].

Los cortes se lavaron abundantemente con agua destilada y se teñieron durante 10 minutos con tinción Tricrómica de Gomori (con la formulación descrita anteriormente). Se añadieron unas pocas gotas de ácido acético al 0,2 %. A continuación, se deshidrataron los cortes mediante dos baños en etanol de 95 % y otros dos en etanol absoluto. Se lavaron las muestras con xileno (2 baños de 10 minutos cada uno). Se montaron los cubres con bálsamo de Canadá (Sigma-Aldrich) y se dejaron secar a 37 °C toda la noche. En la visualización de los cortes teñidos mediante la técnica descrita, observaremos como el hueso toma distintas tonalidades según su grado de madurez y calcificación. Así pues el osteoide se teñirá de color rojo, y conforme madure el hueso irá adquiriendo una tonalidad más azulada. El tejido fibroso se teñirá de color rojo, al igual que los citoplasmas celulares (Figura 38).

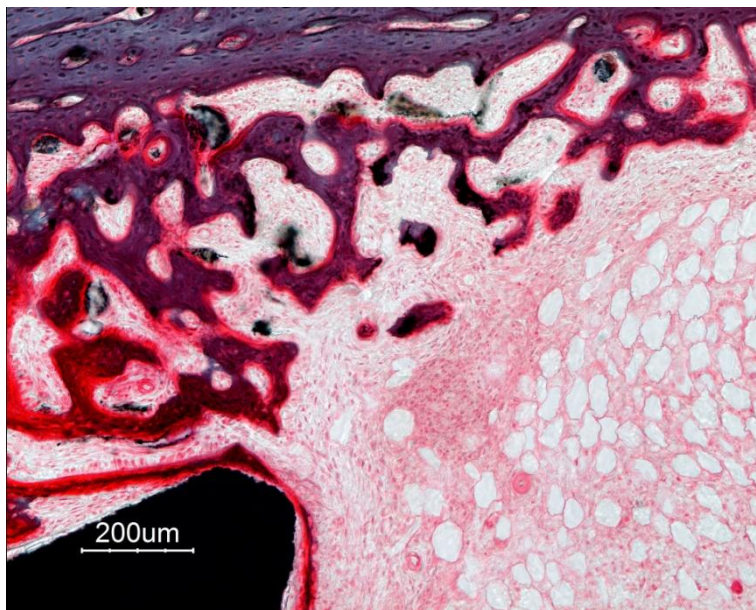


Figura 38. Imagen de microscopía óptica de sección transversal de tibia de conejo teñida mediante Tricrómico de Gomori donde se muestra en rojo el osteoide, así como los osteoblastos, el tejido fibroso conjuntivo medular y el endostio. Conforme al grado de maduración alcanzado, el hueso pasa de un rojo oscuro a un color azulado.

El estudio histológico de los cortes se realizó mediante observación a microscopio óptico Nikon Eclipse E600 con cámara Nikon DXM1200 acoplada al sistema óptico y mediante software Nikon ACT-1 de tratamiento de imagen (Nikon, Tokio; Japón) para las muestras de la **Fase de Caracterización I**. Para el estudio histológico de las muestras de la **Fase de Caracterización II** se empleó un microscopio vertical Eclipse 80i (Nikon Corporation, Tokio; Japón), utilizando el campo claro.

3.2.2. Evaluación de la respuesta de reacción a cuerpo extraño

Este estudio se realizó para las muestras de cada Fase de Caracterización, analizando los cuatro periodos de estudio en el caso de la primera fase y de los dos correspondientes a la segunda (Tabla 13). Tras la observación de las muestras al microscopio, se procedió a la toma de imágenes de cada uno de los parámetros estudiados, abajo detallados.

	<i>Fase de Caracterización I</i>	<i>Fase de Caracterización II</i>
<i>Estudio de Biocompatibilidad</i>	7M3T, 5V5G, 5M5G y Control	7M3T, 7M3T+G, 3X y Control

Tabla 13. Muestras utilizadas para los estudios de evaluación de la respuesta de reacción a cuerpo extraño de ambas Fases de Caracterización.

Se evaluó semicuantitativamente la respuesta del organismo frente a un cuerpo extraño (implante) como indicador de biocompatibilidad del sistema implante-huésped. Esta respuesta es una reacción reparativa, desencadenada por la presencia de un cuerpo extraño exógeno, que tiende a delimitar al cuerpo extraño y, si es posible, eliminarlo. La respuesta del organismo ante la presencia de los cuerpos extraños es una reacción inflamatoria no alérgica en la que se desarrolla una respuesta de histiocitos y células gigantes que tienden a delimitar primero y eliminar después por mecanismos de fagocitosis. La respuesta del huésped al implante es una respuesta natural que tiene lugar para alcanzar la reparación de la lesión, su prolongación en el tiempo del estímulo desencadena secundariamente una reacción de fibrosis [5, 35].

Se desarrolló un sistema semicuantitativo, siguiendo las recomendaciones de la Norma ISO 10993-6 y la bibliografía por ella recomendada, para evaluar los efectos locales después de la implantación de las distintas formulaciones de los recubrimientos sol-gel [165, 166, 184, 185]. La norma es de directa aplicación puesto que se trata de un biomaterial implantable y degradable/resorbible. Algunos de los ítems histológicos propuestos para evaluar la inflamación no pudieron ser considerados ya que la presencia del implante de titanio limita el espesor de los cortes histológicos a un mínimo de 30 μm , lo que provoca una gran superposición de planos, limitando el enfoque a un máximo de 40X, incluso en ocasiones de 20X, impidiendo el detalle celular. No hubo posibilidad de suplir esta limitación por la realización de ensayos inmunohistoquímicos. Los parámetros a evaluar fueron:

1. Condición de la médula ósea; aplasia (1), pérdida de arquitectura (2), aspecto en zonas de la médula de no contacto con el implante (3), ratio de grasa (4).
2. Necrosis, definida como el nivel de traumatismo en hueso cortical (5) y hueso trabecular (6) ocasionado por efectos de la implantación.
3. Presencia de células gigantes de reacción a cuerpo extraño (7), adheridas en las distintas superficies (titanio en caso del control y recubrimiento en caso de los materiales sol-gel).
4. Presencia de la fibrosis/cápsula fibrosa en médula (8), entre la cortical y el implante (9), entre el hueso trabecular y el implante (10) y grado de densificación (11).
5. Neovascularización (12).

En el apartado **ANEXO 3** de esta Tesis se encuentran las plantillas de puntuación a rellenar durante la observación, al microscopio óptico, de las muestras histológicas para la evaluación de la biocompatibilidad de los sistemas huésped-implante.

La intensidad de los ítems histológicos fue puntuada como; - = no (0), + = poco frecuente (1), ++ = moderadamente frecuente (2), +++ = muy frecuente (3). El total de la puntuación para cada uno de los 12 ítems fue obtenida, calificando de no irritante (puntuación de 0 a 6), levemente irritante (puntuación de 6 a 18), moderadamente irritante (puntuación de 18 a 30) o severamente irritante (puntuación de 30 a 36) a los distintos recubrimientos y el control. La evaluación se realizó por triplicado en tres tiempos distintos y no consecutivos, tras el procesado de los datos se realizó un estudio estadístico.

La significación de los resultados fue determinada empleando el programa estadístico SPSS 17.0 ($p < 0,05$). Para la comparación de medias de más de dos muestras se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y para la comparación de medias de dos muestras se empleó un Test T-Student, ambos test se realizaron siempre y cuando el Test de Levene determinara la homogeneidad de la varianza. Para los conjuntos de datos en los que no se cumplió la homocedasticidad, se realizó un Test no paramétrico de Kruskal Wallis de k muestras independientes. Las tablas resultado del estudio estadístico se muestran en el **ANEXO 1** para la **Fase de Caracterización I** y en el **ANEXO 2** para la **Fase de Caracterización II**.

De la observación de los cortes histológicos de las muestras implantadas, para la puntuación de los ítems utilizados en el estudio semicuantitativo de la reacción a cuerpo extraño, se extrajo un estudio cualitativo de los principales eventos indicativos de la biocompatibilidad del sistema implante-huésped como son; el estado de la médula ósea, la presencia de células gigantes de reacción a cuerpo extraño y la formación y evolución de la cápsula fibrosa. Se procuró tomar imágenes representativas de cada uno de los eventos mencionados para cada material y cada periodo de ensayo.

3.2.3. Evaluación de la osteointegración

Aun existiendo la limitación en el grosor de los cortes histológicos y asumiendo que, tal y como explica López-Bravo, “estaríamos cometiendo un error al extrapolar la observación de un solo corte histológico, que es un plano, al todo”, [236] en esta Tesis se reconoce la necesidad de realizar un estudio histomorfométrico que dé como resultado un estudio estadístico con el que la comunidad científica pueda comparar los distintos biomateriales que cada año se desarrollan, de una forma lo más

estandarizada posible. Es por ello que, para evaluar la capacidad de osteointegración de los distintos recubrimientos en referencia al titanio puro granallado, se realizó un estudio histomorfométrico. Como se ha definido anteriormente en la Introducción, la capacidad de osteointegración es la capacidad de un material para conseguir una conexión estructural y funcional entre hueso e implante sin intervención de tejido fibroso ni inflamación crónica [36, 236, 17]. La capacidad de osteointegración fue evaluada prestando atención a los siguientes parámetros; Hueso en contacto con el implante (en inglés *Bone in Contact*, BIC), el Hueso entre roscas y el Hueso peri-implante, hueso dentro de una región de interés (*Region of Interest*, ROI) establecida a una distancia de 100 μm de la superficie del implante.

Además del estudio histomorfométrico, se realizó un estudio histológico en el que se evaluó cualitativamente la osteointegración del implante con el hueso cortical, su osteointegración con el hueso trabecular y la activación osteoblástica.

Estudio histológico

Para el estudio histológico de la osteointegración, todos los cortes histológicos de las muestras implantadas (Tabla 14) fueron observados al microscopio óptico, prestando atención a los eventos indicativos de la osteointegración como son: la necrosis ósea, la formación de cápsula fibrosa interpuesta entre el hueso y el implante, la activación osteoblástica, la formación de nuevas espículas óseas, la formación de nuevo hueso al finalizar el ensayo, el contacto íntimo entre el hueso y el implante, etc. Se procuró tomar imágenes representativas de cada uno de los eventos mencionados para cada material y cada periodo de ensayo.

	<i>Fase de Caracterización I</i>	<i>Fase de Caracterización II</i>
<i>Estudio histológico</i>	7M3T, 5V5G,5M5G y Control	7M3T, 7M3T+G, 3X y Control

Tabla 14. Muestras utilizadas para los estudios histomorfométricos de ambas Fases de Caracterización.

Estudio histomorfométrico

Se realizaron cuatro estudios histomorfométricos distintos: dos estudios sobre las imágenes completas de cada corte histológico, uno para cada Fase de Caracterización, (a los que llamamos (1) ***Histomorfometría Panorámica de la Fase de Caracterización I*** y (2) ***Histomorfometría Panorámica de la Fase de Caracterización II***) y otros dos

estudios histomorfométricos detallados (a los que llamamos (3) **Histomorfometría Detallada de la Fase de Caracterización I** e (4) **Histomorfometría Detallada de la Fase de Caracterización II**), tal y como se muestra en la (Tabla 15).

	Fase de Caracterización I	Fase de Caracterización II
Histomorfometría Panorámica	7M3T, 5V5G, 5M5G y Control	7M3T, 7M3T+G, 3X y Control
Histomorfometría Detallada	7M3T, 5V5G, 5M5G y Control	7M3T, 7M3T+G, 3X y Control

Tabla 15. Muestras utilizadas para los estudios histomorfométricos de ambas Fases de Caracterización.

Histomorfometría Panorámica

En este primer estudio, se incluyeron todas las muestras procedentes de cada Fase de Caracterización. Se tomaron imágenes panorámicas de cada muestra. Para las muestras de la **Fase de Caracterización I** se tomaron imágenes con microscopio óptico a pocos aumentos (2X) de toda la sección de cada corte histológico, que fueron montadas mediante un *photomerge* con el software Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., California; EEUU). Para las muestras de la **Fase de Caracterización II**, debido a que el microscopio utilizado no disponía de bajos aumentos, se procedió a la captura de las imágenes panorámicas con un macroscopio (*Wild M400 Photo Macroscope*, Leica Wetzlar; Alemania), acoplado a una cámara fotográfica Canon EOS 5 (Canon Inc., Tokio; Japón). De estas imágenes se pudieron valorar muchos parámetros como la posición de cada implante en la porción proximal de la tibia, el alcance de la formación de nuevo hueso trabecular a lo largo del implante y el éxito del modelo experimental.

En estas imágenes se midieron distintos parámetros, tal y como se indica en la Figura 39, con el *software Image J.Ink* (National Institutes of Health, Maryland; EEUU); longitud (VSTi) y anchura internos de la tibia (HSTi), longitud (VSTE) y anchura externos de la tibia (HSTe), espesor de las corticales (derecha E_cor_d e izquierda E_cor_i), área (A_canal) y perímetro (P_canal) del canal medular, área del implante (A_impl), alcance del hueso trabecular desde el endostio a lo largo del implante (derecha EH_ad e izquierda EH_ai) y el contacto del implante con la cortical opuesta (derecha EH_bd e izquierda EH_bi).

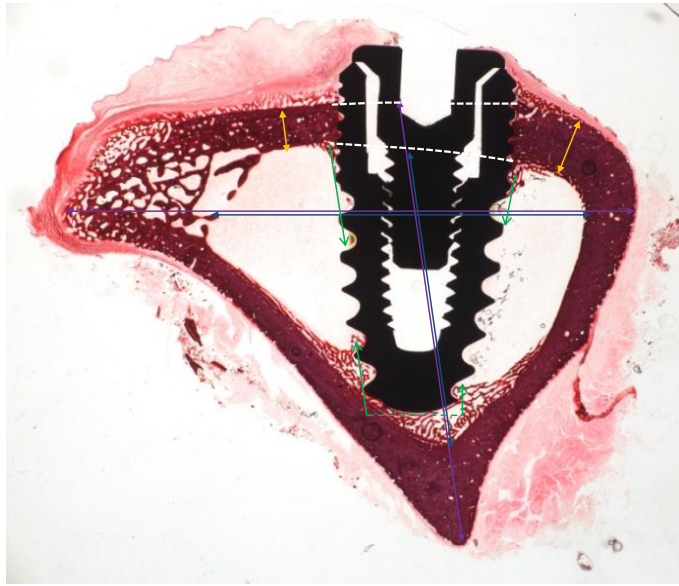


Figura 39. Corte transversal de tibia de conejo con implante dental de Ti, mediante técnica EXAKT® y tinción de Tricrómico de Gomori, donde se muestra cómo se realizaron las medidas histomorfométricas panorámicas: longitud y anchura externos de la tibia (morado), longitud y anchura internos de la tibia (azul), espesor de la cortical (amarillo) y alcance de la formación de hueso trabecular desde el endostio a lo largo del implante (verde).

Todos los datos fueron tratados estadísticamente con el software SPSS 17.0 ($p < 0,05$), realizando un estudio comparativo mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, para comparación de más de dos medias, y para la comparación de medias de dos muestras se empleó un Test T-Student, ambos test se realizaron siempre y cuando el Test de Levene determinara la homogeneidad de la varianza. Para los conjuntos de datos en los que no se cumplió la homocedasticidad, se realizó un Test no paramétrico de Kruskal Wallis de k muestras independientes. Las tablas resultado del estudio estadístico se muestran en el **ANEXO 1** para la **Fase de Caracterización I** y en el **ANEXO 2** para la **Fase de Caracterización II**.

Histomorfometría Detallada

Para la realización del estudio detallado en la **Fase de Caracterización I** se tomaron imágenes con microscopio óptico a pocos aumentos (2X), de toda la sección de cada corte histológico, que fueron montadas mediante un *photomerge* con el software Photoshop CS5. Aún siendo pequeño el tamaño muestral del ensayo de la **Fase de Caracterización I**, grande la variabilidad en la implantación y aunque la distinta localización de cada formulación en la tibia proximal dificultara la comparación de las

distintas formulaciones, se realizó la **Histomorfometría Detallada de la Fase de Caracterización I**.

Para la realización de la **Histomorfometría Detallada de la Fase de Caracterización II**, se tomaron imágenes de microscopía óptica a 10X del perímetro de cada una de las prótesis implantadas, obteniendo una imagen única de cada prótesis radicular tras el montaje de las imágenes parciales con el *software Microsoft Imagen Composite Editor* (Microsoft, Washington; EEUU).

Para las imágenes de ambas fases de caracterización, se trazó un contorno alrededor de la prótesis de 100 μm , estableciendo la Región de Interés (ROI) dentro de la cual se tomarían todas las medidas histomorfométricas peri-implante, como se muestra en la Figura 40.

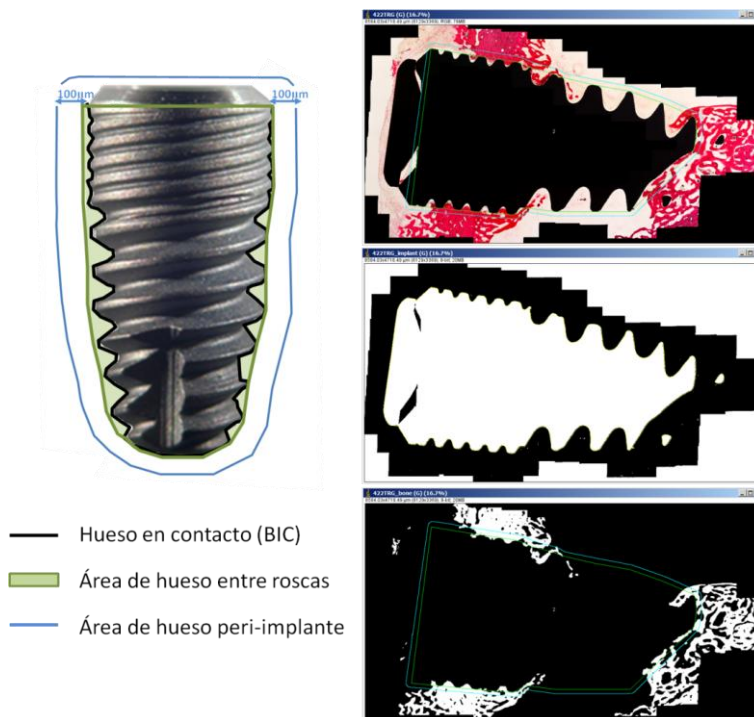


Figura 40. Localización de las medidas para el estudio de **Histomorfometría Detallada** sobre una imagen del implante; superficie sobre la que medir el Hueso en contacto (línea negra), área de hueso entre roscas (superficie verde) y zona donde medir el área de hueso peri-implante (100 μm de anchura desde la superficie del implante hasta la línea azul).

Las variables para la realización del estudio histomorfométrico, fueron:

- *Hueso en contacto con el implante* (BIC del inglés, *Bone in Implant*), determinado como determinada como la cantidad de hueso cortical y trabecular

mineralizado en íntimo contacto con la superficie del implante, expresada en milímetros (mm).

- *Hueso entre roscas*, determinada como el área de hueso mineralizado en el espacio entre roscas existente entre la línea que une los picos de las roscas (línea verde Figura 40) y el fondo de los valles de las roscas del implante (*Área de Hueso entre roscas/Área entre roscas*).

- *Hueso peri-implante*, determinada como el área de hueso mineralizado dentro de la región de interés peri-implante (ROIp), de 100 μm , con relación a la superficie total disponible dentro de la ROIp (*Área de Hueso peri-implante/Área ROIp*) (área indicada por flechas entre la línea blanca y la superficie del implante en la Figura 40).

La significación de los resultados fue determinada empleando el programa estadístico SPSS 17.0 ($p < 0,05$). Para la comparación de medias de más de dos muestras se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y para la comparación de medias de dos muestras se empleó un Test T-Student, ambos test se realizaron siempre y cuando el Test de Levene determinara la homogeneidad de la varianza. Para los conjuntos de datos en los que no se cumplió la homocedasticidad, se realizó un Test no paramétrico de Kruskal Wallis de k muestras independientes. Las tablas resultado del estudio estadístico se muestran en el **ANEXO 1** para la **Fase de Caracterización I** y en el **ANEXO 2** para la **Fase de Caracterización II**.

3.2.4. Degradación sol-gel *in vivo*

Para el estudio de la degradación y la liberación de silicio *in vivo* de los recubrimientos sol-gel desarrollados en la **Fase de Caracterización I**, se eligieron dos de las cinco repeticiones implantadas de cada material y periodo (réplicas numeradas 4 y 5). En la siguiente fase de experimentación se tuvo a bien no repetir este ensayo en beneficio del aumento de réplicas biológicas para el estudio histomorfométrico. Inmediatamente después de su obtención, se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfato 0,1 M (PB) (Aname). Las muestras fueron procesadas según protocolo descrito por J. Wierzchos en 2008 [237].

Como cita Wierzchos en su artículo, los primeros autores en utilizar la técnica de microscopía electrónica de barrido con detector de electrones retrodispersados acoplado (SEM-BSE) para el estudio de la zona de contacto hueso-implante fueron Jasty y colaboradores en 1989 [237]. Seguidamente, fue utilizada por otros autores también para estudios descriptivos de los tejidos calcificados, estudios de reparación de fracturas y de las superficie de implantes. Con el protocolo propuesto por Wierzchos y su grupo, específicos para implantes dentales, se consigue una resolución

mayor con la que explorar los procesos inorgánicos y biológicos de la reparación del tejido óseo que tienen lugar en la zona hueso-implante.

Las muestras permanecieron en inmersión en glutaraldehído (Aname) al 2,5 % en PB 0,1 M (Aname) durante 24 horas a 4 °C, tras lo cual se lavaron en PB 0,1 M en 3 baños de 30 minutos cada uno. Se realizó una segunda fijación con tetraóxido de osmio al 1 % en agua (Aname), de 24 horas a 4 °C. Se repitió la serie de lavados con PB (3 lavados de 30 minutos cada uno). Se procedió a la deshidratación de las muestras mediante series de alcohol crecientes (30 % y 50 %) durante 3 horas cada una. Se continuó la deshidratación con la inmersión de las muestras en alcohol al 70 % saturado de acetato de uranilo (Aname) durante toda la noche a 4 °C. Se continuó con las series crecientes de alcoholes hasta etanol absoluto (Sigma-Aldrich). Tras haber finalizado el proceso de deshidratación, las muestra fueron infiltradas con medio de inclusión LRWhite (LRW, The London Resin Co. Ltd., Hampshire; Reino Unido), primero en una solución 1:1 de LRW en etanol absoluto durante 3 días y a 4 °C, y finalmente durante 9 días con resina pura y a temperatura de 4 °C. La polimerización de las muestras se llevó a cabo en un ambiente libre de oxígeno, durante 24 horas y 60 °C, obteniendo las muestras embebidas en bloques cilíndricos de resina polimerizada.

Mediante una marca, realizada antes del proceso de polimerización, las muestras fueron debidamente orientadas para su corte, mediante una sierra de baja velocidad (Buehler, Illinois; EEUU), siguiendo el eje longitudinal del implante, obteniéndose finalmente dos cortes de cada muestra de sección de 3 a 5 mm de espesor (Figura 41). Las muestras no se pulieron tal y como se indica en el protocolo de Wierzchos y colaboradores ya que se compararon muestras pulidas y sin pulir y estas últimas presentaban menos artefactos a la visualización al SEM. Las muestras se protegieron de la luz y del ambiente hasta su evaluación.

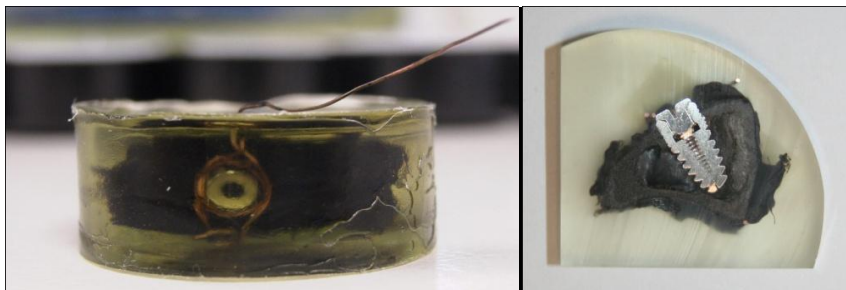


Figura 41. Procesado de las muestras para su observación al SEM. Imagen de una muestra incluida en un bloque de resina LRW (izquierda) y su sección transversal (derecha) tras el corte orientado.

Para su observación al microscopio electrónico de barrido, las muestras fueron sometidas a un proceso de post-tinción mediante baño en solución acuosa saturada de

acetato de uranilo (Aname) durante 30 minutos, seguido de un baño en citrato de plomo (Aname) durante 12 minutos. Se lavaron las muestras con agua destilada y se dejaron secar completamente antes de ser recubiertas con carbono. Para este estudio se utilizó un microscopio electrónico de barrido (LEO 440i), equipado con un detector de electrones retrodispersados (BSE) y microanálisis por dispersión de energía de rayos X (EDX) (Oxford INCA, Oxfordshire; Reino Unido) a 20 kV.

Obtención de las imágenes

La obtención de las imágenes de microscopía electrónica para su posterior estudio, tuvo lugar mediante el siguiente procedimiento. Las muestras fueron estudiadas en relación a las partes de la estructura del implante (cabeza, cuello y cuerpo) que están diseñadas para su anclaje primario a las distintas partes del hueso maxilar (la primera para hueso cortical y las otras dos para hueso trabecular), como se muestra en la Figura 42.

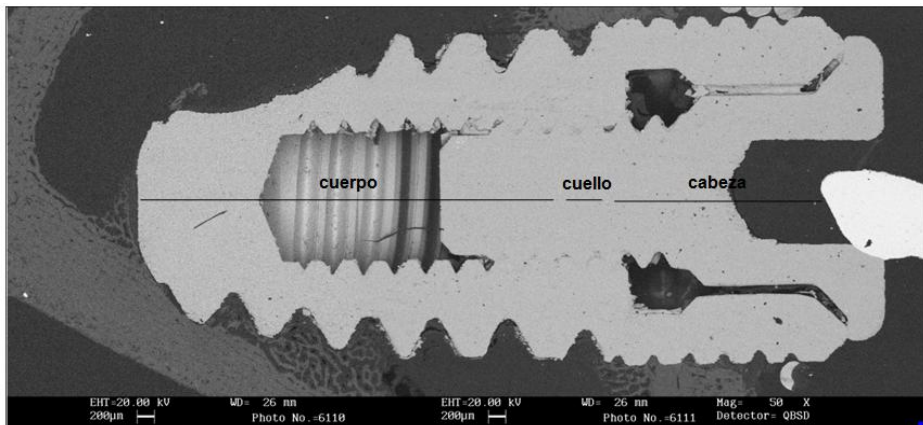


Figura 42. Imagen de SEM de un implante completo implantado en tibia de conejo en la que se puede observar los distintos diseños de cada una de sus partes orientadas a una anatomía ósea diferente. (Imagen obtenida mediante montaje con Adobe Photoshop de dos imágenes tomadas a 50X y 20 kV mediante detector BSE).

De cada una de estas partes estructurales de la muestra, se buscaron, en la zona de contacto hueso-implante, áreas susceptibles de detección de liberación de silicio. La imagen de electrones retrodispersados (BSE) permite diferenciar regiones con números atómicos diferentes y el microanálisis por dispersión de rayos X (EDX) permite realizar un análisis químico de esas zonas diferenciadas, pudiendo relacionar tonos de gris y de luminosidad con abundancia de determinados elementos químicos.

En imagen BSE, podemos distinguir entre el titanio, el hueso (rico en calcio y fósforo), el recubrimiento (rico en silicio) y la resina de inclusión (rica en carbono), según su coloración en escala de gris (dispuestos en orden de más de claro a más

oscuro) y teniendo en cuenta también su morfología característica. Con el microanálisis (ya sea puntual, de un área concreta, un perfil de línea o un mapeado de una imagen completa, Figura 43) podemos cerciorarnos de las distintas zonas que estamos analizando.

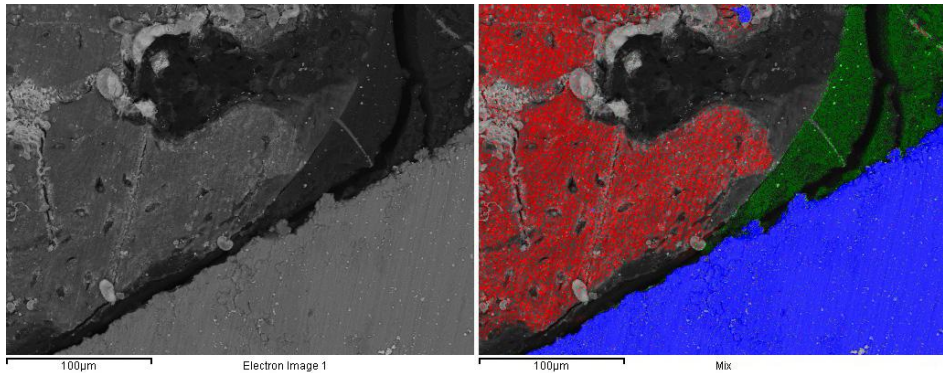


Figura 43. Microanálisis por *mapping* (derecha), de la región seleccionada en la imagen de SEM-BSE (izquierda), en la que se puede diferenciar el hueso (rojo), el recubrimiento (verde) y el implante (azul).

En las zonas susceptibles de detección de la liberación de silicio, se observa una coloración intermedia entre el recubrimiento y el hueso sin bordes definidos, como se muestra en la imagen siguiente (Figura 44).

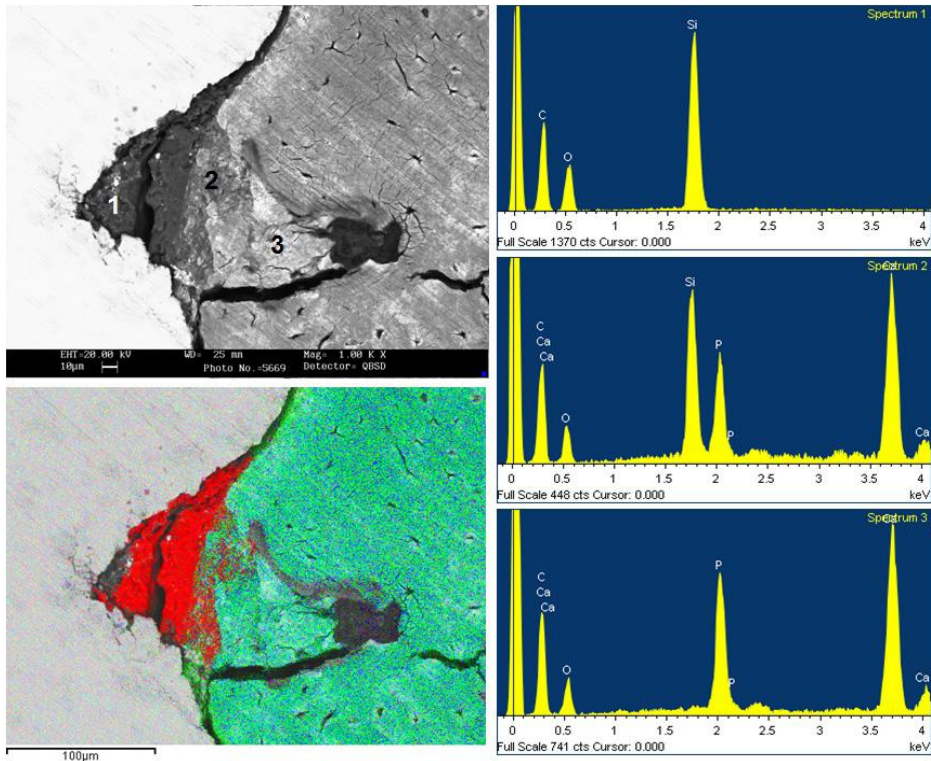


Figura 44. Estudio de liberación de silicio de la red sol-gel. Imagen de SEM-BSE de la zona de contacto implante-recubrimiento-hueso, en la que se observa una zona intermedia (2) entre el recubrimiento (1) y el hueso (3) (arriba izquierda). Los espectros de microanálisis (derecha) muestran los elementos químicos contenidos en cada una de estas zonas, determinando que en la zona 2 (espectro 2) existe interacción hueso-recubrimiento por medio de liberación de silicio (Si). En el mapping de la imagen SEM-BSE (abajo izquierda) se distingue el recubrimiento (rojo) del hueso (verde).

Tras la detección, mediante reconocimiento visual, de las posibles zonas de detección de liberación de silicio y su confirmación mediante microanálisis puntual, se tomaron imágenes de BSE a 1.000X y se realizó un análisis por perfil lineal a 300 frames.

Para la **Fase de Caracterización II** el estudio de la degradación *in vivo* se realizó mediante cuantificación del recubrimiento a través del análisis de las imágenes histológicas mediante Image J.Ink, tanto para la zona en contacto con el hueso cortical como para el hueso trabecular (Figura 45).

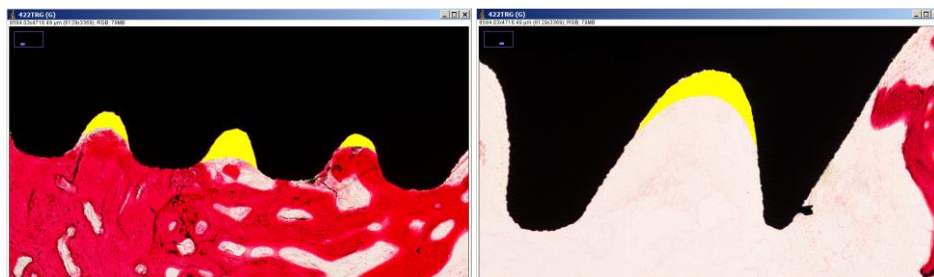


Figura 45. Imágenes de microscopía óptica (10X) de sección transversal de tibia de conejo con implante dental de titanio, corte mediante técnica EXAKT® y tinción Tricrómica de Gomori, de la zona de la cabeza (izquierda) y del cuerpo (derecha) de la prótesis radicular. En amarillo se muestra la zona ocupada por el recubrimientos en los valles, para su cuantificación mediante análisis de imagen mediante Image J.

Tras la cuantificación del espesor del recubrimiento persistente tras cada periodo de implantación, se realizó un estudio estadístico de los resultados. La significación de los resultados fue determinada empleando el programa estadístico SPSS 17.0 ($p < 0,05$). Para la comparación de medias de más de dos muestras se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y para la comparación de medias de dos muestras se empleó un Test T-Student, ambos test se realizaron siempre y cuando el Test de Levene determinara la homogeneidad de la varianza. Para los conjuntos de datos en los que no se cumplió la homocedasticidad, se realizó un Test no paramétrico de Kruskal Wallis de k muestras independientes. Las tablas resultado del estudio estadístico se muestran en el **ANEXO 1** para la **Fase de Caracterización I** y en el **ANEXO 2** para la **Fase de Caracterización II**.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS DE LA *Fase de Caracterización I*: CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS FORMULACIONES

Se sintetizaron tres series distintas de recubrimientos a partir de los precursores MTMOS, VTES, TEOS y GPTMS, según las condiciones de síntesis, recubrimiento y curado descritas en el Capítulo 2. Cada una de estas tres series, MTMOS:TEOS, VTES:GPTMS y MTMOS:GPTMS, se compuso de tres formulaciones distintas variando la proporción de sus precursores (90MTMOS:10TEOS, 80MTMOS:20TEOS; 70MTMOS:30TEOS, 80VTES:20GPTMS, 50VTES:50GPTMS, 20VTES:80GPTMS, 80MTMOS:20GPTMS, 50MTMOS:50GPTMS, 20MTMOS:80GPTMS).

Para todas las formulaciones se obtuvo un sol transparente y sin precipitados, con una viscosidad adecuada para obtener una aplicación correcta sobre el material.

Se realizó un ensayo previo de citotoxicidad de los precursores base utilizados, para descartar posibles efectos tóxicos sobre las células. Se realizaron ensayos celulares iniciales de proliferación y diferenciación de células mesenquimales (hAMSC) que condujeron a seleccionar las formulaciones óptimas, de cada una de las tres familias de recubrimientos, en función del comportamiento celular inducido. De cada familia distinta de recubrimientos (MTMOS:TEOS, VTES:GPTMS y MTMOS:GPTMS) fue seleccionada aquella formulación que mejor comportamiento celular indujo.

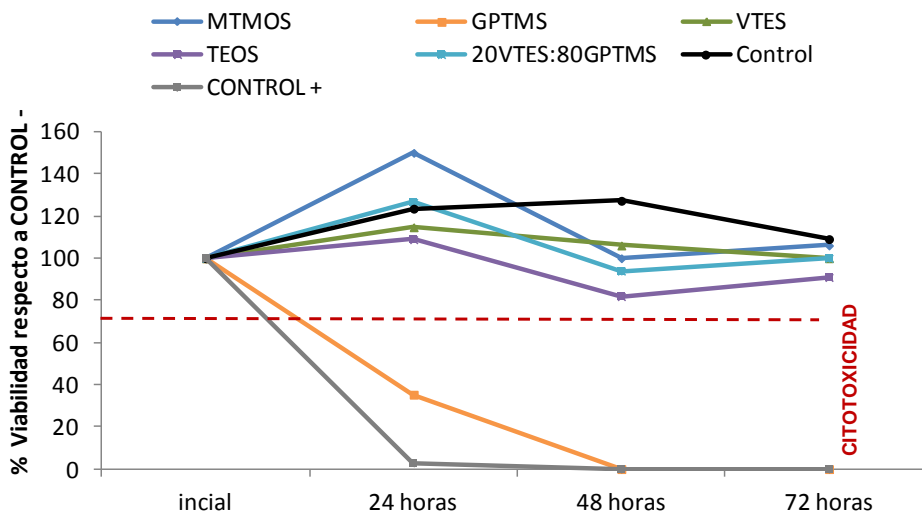
Se prosiguió a la caracterización físico-química y biológica de las tres formulaciones seleccionadas, mediante una batería de ensayos descritos a continuación a lo largo de este capítulo, así como de una caracterización de su síntesis y su deposición.

Citotoxicidad y viabilidad de los precursores

Con el objetivo de estudiar los posibles efectos tóxicos de los recubrimientos sobre las células, se realizó un ensayo de citotoxicidad de los precursores base que iban a ser utilizados para la formulación de las series de recubrimientos. Se midió la viabilidad celular como medida directamente proporcional a la actividad mitocondrial registrada mediante ensayo de MTT descrito en el Capítulo 3.

Para estos ensayos se utilizaron cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro recubiertos mediante técnica *drop-coating*, consistente en depositar una gota de recubrimiento sobre la superficie, en nuestro caso una gota de 10 μ l.

En la Gráfica 1 se presentan los resultados de citotoxicidad para cada uno de los precursores base (MTMOS; VTES; TEOS y GPTMS). Se encontró que únicamente las formulaciones con GPTMS puro eran citotóxicas y por ello se comprobó, ya inicialmente, si dicha citotoxicidad podía ser reducida a partir de mezclas con el resto de precursores. Así, se introdujo la formulación doble 20VTES:80GPTMS que, con sólo el 20 % de VTES, pudo reducir la toxicidad del GPTMS puro por encima los límites establecidos por la ISO-10993-5 (sobrepasando el 70 % de la viabilidad del CONTROL-) [170].



Gráfica 1. Porcentaje de viabilidad de hAMSCs respecto al CONTROL - (vidrio).

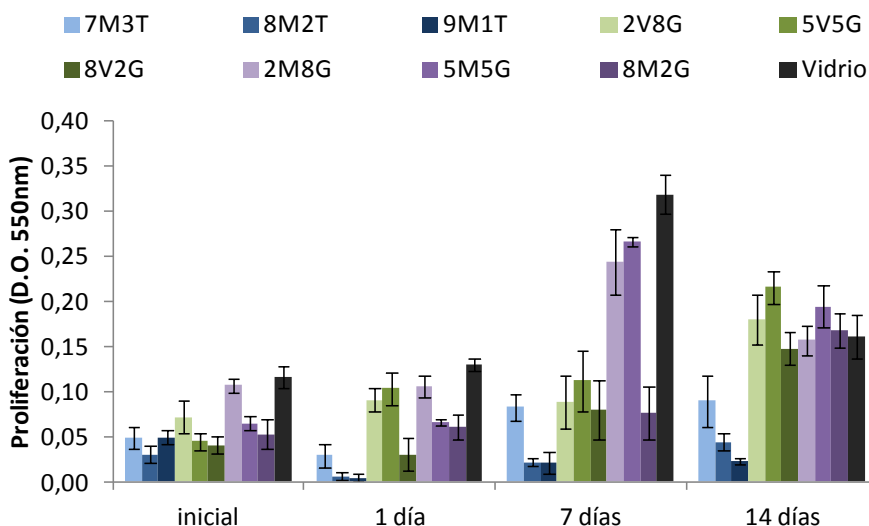
La citotoxicidad del GPTMS puede venir como consecuencia de la gran reactividad que posee por el grupo funcional que forma parte de su composición, un grupo epoxi.

Proliferación

Mediante el mismo ensayo, de medición de la actividad mitocondrial (MTT), se estudio de viabilidad celular para periodos de incubación de 1, 7 y 14 días con el objetivo de estudiar los efectos de los recubrimientos sobre la proliferación celular. En este caso también se emplearon cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro recubiertos mediante técnica *drop-coating*, consistente en depositar una gota de recubrimiento sobre la superficie, en nuestro caso una gota de 10 μ l.

En la Gráfica 2 se muestran los valores de proliferación celular (D.O.) obtenidos para las tres series de formulaciones sol-gel y el control (vidrio). El mayor contenido en TEOS en las formulaciones de la serie MTMOS:TEOS indujo significativamente una mayor proliferación a todos los periodos de ensayo. El máximo contenido de VTES en las formulaciones de la serie VTES:GPTMS indujo una menor proliferación dentro de la

serie, sin embargo la formulación con el 50 % de VTES mostró la mayor tasa de proliferación de la serie tras dos semanas de ensayo. La mayor adhesión inicial fue al sustrato con tan sólo el 20 % de VTES. Para uno y siete días de ensayo los recubrimientos 5V5G y 2V8G mostraron mayores valores que 8V2G. En la serie MTMOS:GPTMS, el menor porcentaje de GPTMS indujo una adhesión inicial y una proliferación a 1 y 7 días significativamente mayor que el resto de recubrimientos de la serie. Tras 7 días, 5M5G indujo unos valores de proliferación que no mostraron diferencias significativas con 2M8G. A 14 días, las tres formulaciones de la serie indujeron valores de proliferación celular muy similares, siendo menores los inducidos por 2M8G.



Gráfica 2. Valores de proliferación de las tres series de recubrimientos y el Control.

Los valores de adhesión inicial fueron significativamente mayores por orden decreciente para el vidrio, 2M8G, 2V8G y 5M5G, manteniéndose para un día de ensayo y mostrando los mayores valores también a 1 día conjuntamente a 5V5G, que dobló su población celular respecto a la adhesión inicial. Tras una semana de ensayo, el vidrio indujo los mayores valores de proliferación, seguido de 2M8G y 5M5G (sin diferencias significativas entre ellos). A dos semanas de ensayo, los valores para las series VTES:GPTMS y MTMOS:GPTMS y el Control indujeron valores similares de proliferación celular, aunque 5V5G mostró valores significativamente mayores que el resto de materiales de las series y que el Control. Para todos los periodos, la serie MTMOS:TEOS indujo los menores valores de proliferación celular.

La serie MTMOS:GPTMS no mostraron diferencias entre los valores de adhesión inicial y la proliferación tras 1 día de incubación. 8M2Ty 2V8G no mostraron diferencias

entre sus valores inducidos de proliferación a tiempo cero y 7 días, así como 2V8G, 8V2G y 8M2G no mostraron diferencias entre 1 y 7 días de incubación. 7M3T no mostró diferencias para los valores de proliferación inducidos entre 1 y 2 semanas de incubación.

	p-valor			
	0 días	1 día	7 días	14 días
Control-7M3T	0,000	0,000	0,000	0,000
7M3T-8M2T	0,002	0,000	0,000	0,001
8M2T-9M1T	0,000	0,223	0,192	0,000
9M1T-2V8G	0,000	0,000	0,000	0,000
2V8G-5V5G	0,000	0,093	0,166	0,009
5V5G-8V2G	0,370	0,000	0,049	0,000
8V2G-2M8G	0,000	0,000	0,000	0,954
2M8G-5M5G	0,000	0,000	0,166	0,002
5M5G-8M2G	0,118	0,174	0,000	0,002
Control-8M2T	0,000	0,000	0,000	0,000
Control-9M1T	0,000	0,000	0,000	0,000
Control-2V8G	0,000	0,000	0,000	0,021
Control-5V5G	0,000	0,000	0,000	0,000
Control-8V2G	0,000	0,000	0,000	0,402
Control-2M8G	0,021	0,000	0,000	0,751
Control-5M5G	0,000	0,000	0,000	0,004
Control-8M2G	0,000	0,000	0,000	0,603
7M3T-9M1T	0,817	0,000	0,000	0,000
7M3T-2V8G	0,009	0,000	0,644	0,000
7M3T-5V5G	0,452	0,000	0,023	0,000
7M3T-8V2G	0,125	0,685	0,751	0,001
7M3T-2M8G	0,000	0,000	0,000	0,000
7M3T-5M5G	0,008	0,000	0,000	0,000
7M3T-8M2G	0,563	0,000	0,885	0,000
8M2T-2V8G	0,000	0,000	0,000	0,000
8M2T-5V5G	0,003	0,000	0,000	0,000
8M2T-8V2G	0,026	0,000	0,000	0,000
8M2T-2M8G	0,000	0,000	0,000	0,000
8M2T-5M5G	0,000	0,000	0,000	0,000

	p-valor			
	0 días	1 día	7 días	14 días
8M2T-8M2G	0,005	0,000	0,000	0,000
9M1T-5V5G	0,285	0,000	0,000	0,000
9M1T-8V2G	0,040	0,000	0,000	0,000
9M1T-2M8G	0,000	0,000	0,000	0,000
9M1T-5M5G	0,000	0,000	0,000	0,000
9M1T-8M2G	0,140	0,000	0,000	0,000
2V8G-8V2G	0,000	0,000	0,285	0,021
2V8G-2M8G	0,000	0,037	0,000	0,021
2V8G-5M5G	0,817	0,000	0,000	0,118
2V8G-8M2G	0,164	0,000	0,299	0,214
5V5G-2M8G	0,000	0,563	0,000	0,000
5V5G-5M5G	0,000	0,000	0,000	0,022
5V5G-8M2G	0,119	0,000	0,021	0,000
8V2G-5M5G	0,000	0,000	0,000	0,006
8V2G-8M2G	0,030	0,000	0,644	0,272
2M8G-8M2G	0,000	0,000	0,000	0,470

	p-valor					
	0-1 día	0-7 días	0-14 días	1-7 días	1-14 días	7-14 días
Control	0,004	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
7M3T	0,004	0,000	0,001	0,000	0,001	0,053
8M2T	0,000	0,088	0,003	0,000	0,000	0,000
9M1T	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040
2V8G	0,008	0,247	0,000	0,817	0,000	0,000
5V5G	0,000	0,000	0,000	0,817	0,000	0,000
8V2G	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
2M8G	0,525	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5M5G	0,469	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8M2G	0,453	0,033	0,000	0,166	0,000	0,000

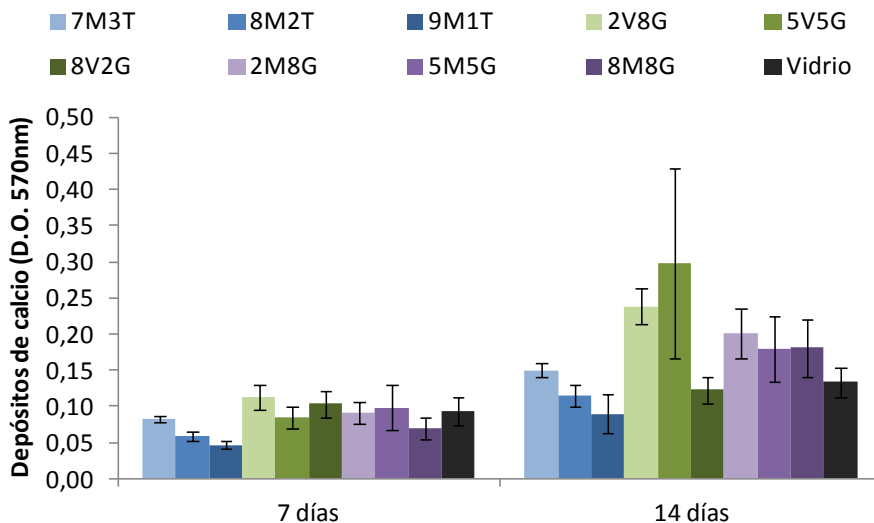
Diferenciación

Tras cultivo con medio de diferenciación osteogénico se cuantificó la deposición de calcio (Rojo alizarina), indicativo de diferenciación de las células mesenquimales hacia linaje osteoblástico y mineralización de la matriz.

La Gráfica 3 muestra la cuantificación de calcio detectada como indicador de mineralización inducida por cada una de las distintas formulaciones de las tres series de recubrimientos desarrolladas. Los recubrimientos 8V2G y la serie MTMOS:GPTMS indujeron la misma diferenciación que el vidrio tras 7 días de cultivo con medio osteogénico. Los valores de diferenciación para la serie MTMOS:TEOS disminuyeron conforme aumentó el porcentaje de TEOS, siendo todos ellos menores significativamente que el Control.

A 14 días, el Control y el material 8V2G fueron los que menor crecimiento presentaron respecto a una semana, no habiendo diferencias significativas entre ellos ni entre el Control y el 7M3T. De la serie MTMOS:TEOS, los valores de diferenciación fueron directamente proporcionales al contenido de TEOS. Para la serie VTES:GPTMS

los mayores valores fueron para 5V5G, seguido de 2V8G, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticas entre ellos debido a la gran dispersión de los datos para 5V5G. Para los valores inducidos por la serie MTMOS:GPTMS no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 3. Valores de mineralización mediada por cuantificación de depósitos de calcio en cultivo con medio osteogénico de las tres series de recubrimientos y el Control.

El titanio y todos los recubrimientos indujeron una mayor diferenciación a 14 que a 7 días de ensayo, a excepción de 8V2G cuyos valores no mostraron diferencias significativas entre ambos periodos de estudio.

	p-valor	
	7 días	14 días
Control-7M3T	0,049	0,369
7M3T-8M2T	0,000	0,000
8M2T-9M1T	0,001	0,009
9M1T-2V8G	0,000	0,000
2V8G-5V5G	0,001	0,644
5V5G-8V2G	0,021	0,000
8V2G-2M8G	0,523	0,000
2M8G-5M5G	0,750	0,149
5M5G-8M2G	0,007	0,728
Control-8M2T	0,037	0,068
Control-9M1T	0,037	0,043
Control-2V8G	0,037	0,043
Control-5V5G	0,002	0,000
Control-8V2G	0,644	0,106
Control-2M8G	0,643	0,005
Control-5M5G	0,885	0,049
Control-8M2G	0,069	0,235
7M3T-9M1T	0,000	0,000
7M3T-2V8G	0,005	0,000
7M3T-5V5G	0,340	0,000
7M3T-8V2G	0,000	0,000
7M3T-2M8G	0,030	0,001
7M3T-5M5G	0,487	0,164
7M3T-8M2G	0,006	0,020
8M2T-2V8G	0,000	0,000
8M2T-5V5G	0,000	0,000
8M2T-8V2G	0,000	0,026
8M2T-2M8G	0,000	0,000
8M2T-5M5G	0,002	0,000

	p-valor	
	7 días	14 días
8M2T-8M2G	0,012	0,000
9M1T-5V5G	0,000	0,000
9M1T-8V2G	0,000	0,001
9M1T-2M8G	0,000	0,000
9M1T-5M5G	0,000	0,000
9M1T-8M2G	0,000	0,000
2V8G-8V2G	0,643	0,000
2V8G-2M8G	0,012	0,018
2V8G-5M5G	0,032	0,001
2V8G-8M2G	0,000	0,001
5V5G-2M8G	0,165	0,057
5V5G-5M5G	0,524	0,032
5V5G-8M2G	0,037	0,021
8V2G-5M5G	0,643	0,021
8V2G-8M2G	0,000	0,000
2M8G-8M2G	0,003	0,064

p-valor 7-14 días	
Control	0,026
7M3T	0,000
8M2T	0,000
9M1T	0,040
2V8G	0,000
5V5G	0,000
8V2G	0,013
2M8G	0,000
5M5G	0,000
8M2G	0,000

Tras la evaluación de los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación y mineralización con hAMSCs, se concluyó que los recubrimientos 7M3T y 5V5G fueron los mejores de su serie. Para la serie MTMOS:GPTMS, los valores de proliferación y mineralización fueron muy similares, sin embargo, se decidió seleccionar la formulación 5M5G por presentar menor cantidad de grupos -epoxi y así reducir su reactividad.

Así pues, fueron estos tres recubrimientos; 7M3T, 5V5G y 5M5G los recubrimientos seleccionados (Figura 46).

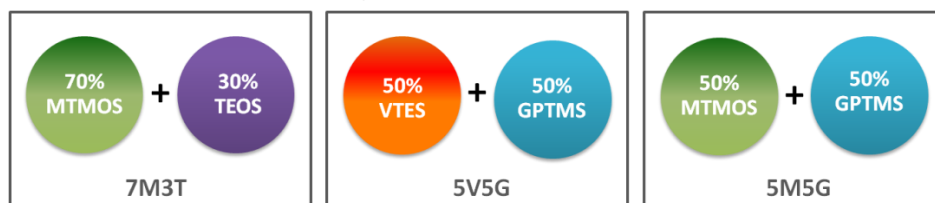


Figura 46. Formulaciones seleccionadas para la *Fase de Caracterización I* tras el cribado celular inicial de las formulaciones de las tres series de recubrimientos: MTMOS:TEOS, VTES:GPTMS y MTMOS:GPTMS.

Estos recubrimientos fueron objeto de una caracterización completa que comprendió; (1) la caracterización de su síntesis y deposición, (2) su caracterización

físico-química y (3) una caracterización de los efectos biológicos que estos recubrimientos pudieran inducir.

1. Síntesis y deposición

Como se ha indicado anteriormente, se obtuvo un sol transparente y sin precipitados, con una viscosidad adecuada para obtener una aplicación correcta sobre el material. Como resultado, se obtuvo una película de los recubrimientos seleccionados sobre discos e implantes apreciada por el brillo que el recubrimiento otorgó a la superficie granallada del titanio.

Tanto en el caso de los discos como los implantes, el proceso de curado tuvo lugar en sentido vertical, debido a ello se formó una rebaba de recubrimiento en el borde inferior de los discos. La película formada sobre los discos fue continua, no así como la formada en el caso de los implantes donde el recubrimiento se acumuló en los valles entre las roscas, quedando sin recubrir algunas zonas de las crestas y dejando el granallado a la vista, como se observó en el microscopio electrónico de barrido (Figura 47).

Fue con esta técnica donde se pudo observar la formación de grietas en el fondo de los valles recubiertos debido al gran espesor de recubrimiento acumulado, puesto que no se observaron en los discos al tratarse de espesores mucho menores. Se observó que la capa discontinua de recubrimiento sobre las prótesis radiculares tenía un espesor muy variable para las formulaciones seleccionadas para el primer estudio *in vivo*, encontrando fuera de los valles espesores de escala nanométrica hasta la veintena de micras (Figura 47, Figura 48, Figura 49 y Figura 50). En los valles del cuerpo de las prótesis, las imágenes de microscopía óptica mostraron (aunque también se encontró mucha variabilidad) espesores mayores, desde 25 μm hasta 200 μm , siendo más habituales espesores mayores para los recubrimientos 5V5G y 5M5G que para 7M3T (Figura 51).

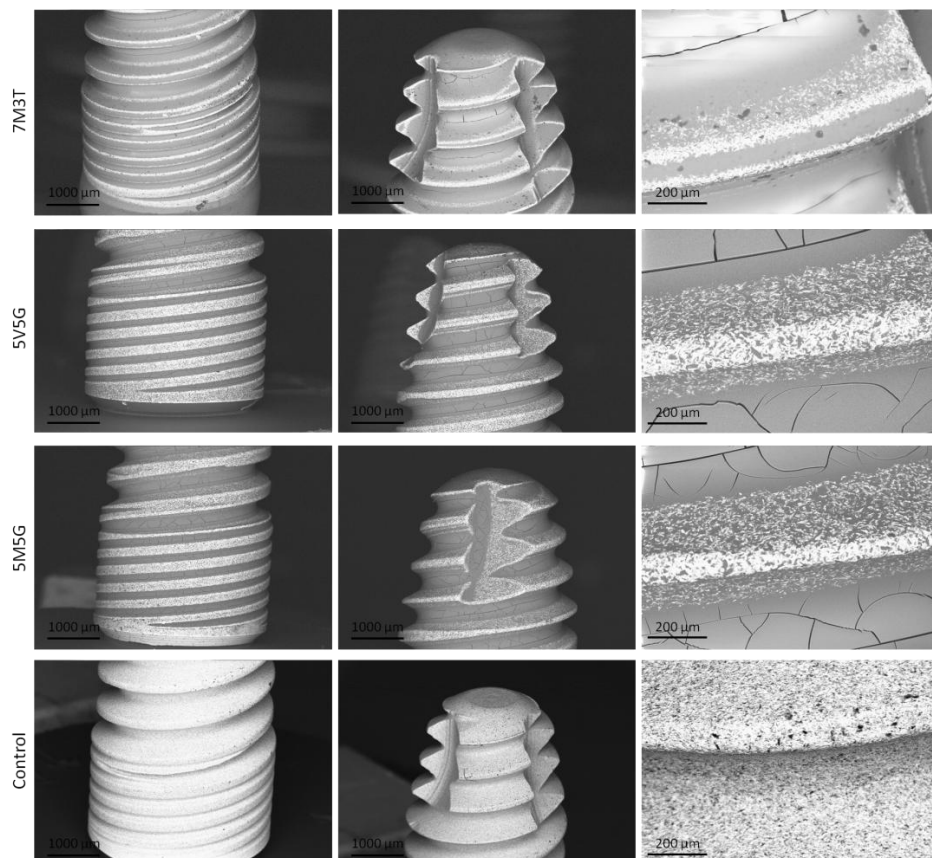


Figura 47. Imágenes de SEM de los implantes recubiertos y el Control; base (izquierda, extremo (centro) y detalle (derecha) de la superficie del implante. Para 7M3T se observan grietas en sentido transversal en mitad de los valles, mientras que para 5V5G y 5M5G las grietas son también en sentido longitudinal, probablemente por un mayor espesor. El recubrimiento no es continuo, dejando ver la superficie granallada del titanio en las crestas de las roscas, zonas blancas en las crestas de igual apariencia que la superficie del control (bajo derecha).

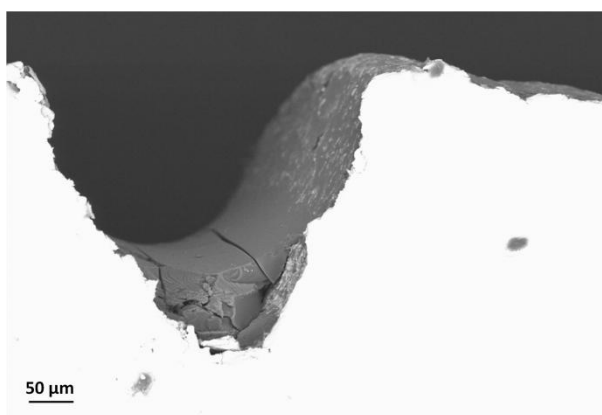


Figura 48. Detalle en una imagen de SEM del espesor del recubrimiento 7M3T sobre la superficie granallada del titanio sin implantar.

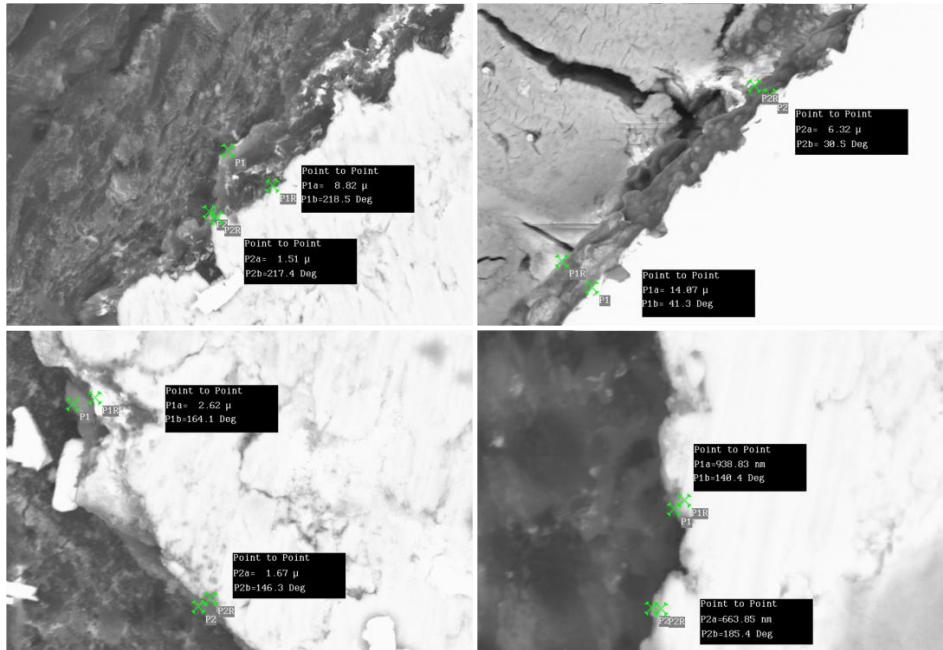


Figura 49. Imágenes de SEM con medición del espesor de la capa de recubrimiento de 7M3T fuera de los valles tras 1 semana de implantación, con valores que van desde los 663,85 nm (abajo derecha) hasta las 14,07 μ m (arriba derecha).

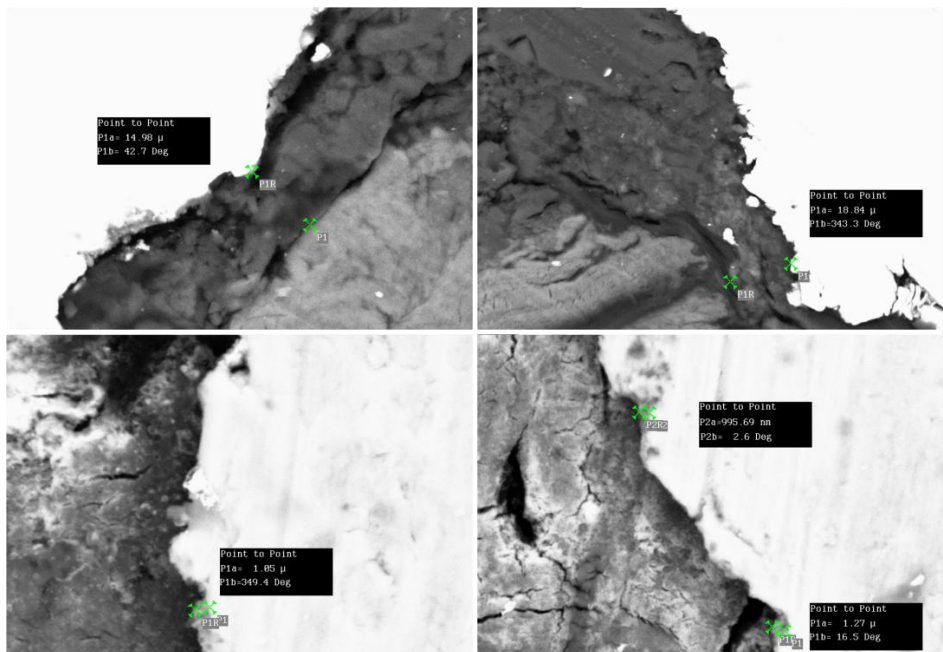


Figura 50. Imágenes de SEM con medición del espesor de la capa de recubrimiento de 5V5G fuera de los valles tras 1 semana de implantación, con valores que van desde las 995,69 nm (abajo derecha) hasta las 18,84 μ m (arriba derecha).

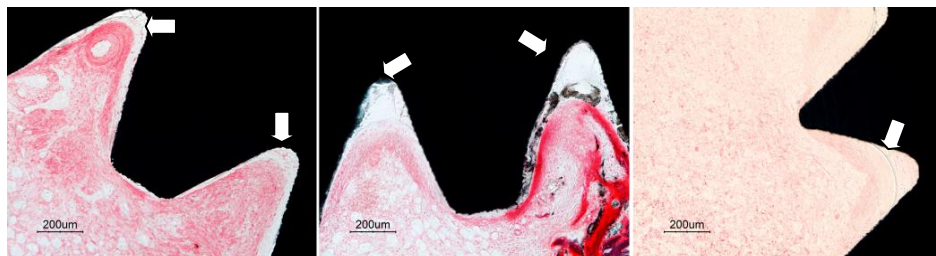


Figura 51. Imágenes de microscopía óptica (10X) de la sección transversal de prótesis radiculares recubiertas con las formulaciones 7M3T (izquierda), 5V5G (centro) y 5M5G (derecha) tras 1 semana de implantación en tibia proximal de conejo (corte mediante técnica EXAKT y tinción Tricrómica de Gomori). En el fondo de los valles se puede observar el espesor de cada uno de los recubrimientos (flechas blancas).

Como se hará evidente a partir de ahora, no fue posible mostrar datos para todos los ensayos para el recubrimiento 5V5G en este trabajo ya que, desde un principio, se decidió no seguir con su caracterización tras la evaluación de los resultados *in vivo*. Sin embargo, al inicio de la redacción de esta Tesis, se decidió volverlo a incluir debido a que se cree puede ser un buen ejemplo cualitativo de Control negativo de osteointegración.

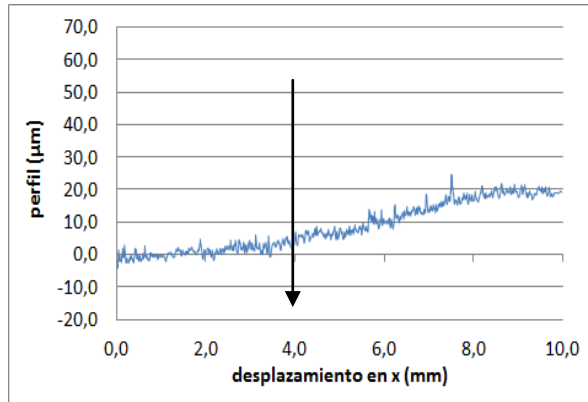
2. Caracterización físico-química

Conforme a lo explicado en la Introducción de esta Tesis, cambios en determinados aspectos de la superficie de los materiales afectan de forma significativa a eventos biológicos tales como la adhesión de las células a su superficie o la inducción a su diferenciación. Es por ello que se determinó caracterizar la superficie de los recubrimientos sintetizados, determinando su topografía, hidrofilia, bioactividad y degradación, así como la liberación de silicio debida a la degradación hidrolítica y su adhesión al titanio, mostrando aquí los resultados obtenidos.

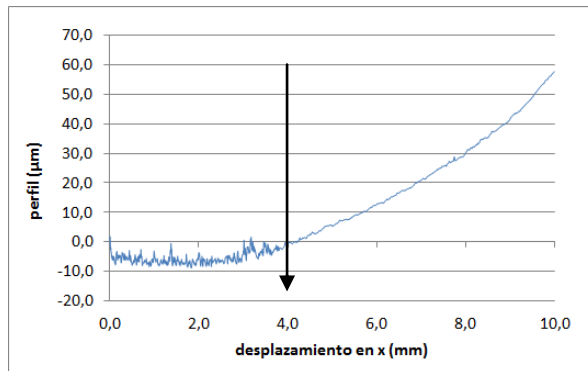
Los sustratos empleados para estos ensayos fueron discos de titanio puro grado 4 de 12 mm de diámetro, 1,2 mm de espesor y 0,5 g de peso, con tratamiento superficial ADS® (que consigue una rugosidad heterogénea), para los ensayos de rugosidad, hidrofilia, bioactividad y degradación. Para el ensayo de adhesión al sustrato, se utilizaron prótesis radiculares comerciales GMI® modelo Frontier de 3,75 mm de diámetro y 8 mm de longitud, también con tratamiento ADS®. Para los ensayos de degradación y liberación *in vitro*, el personal investigador de la Universidad del País Vasco empleó cubreobjetos circulares de vidrio de 18 mm de diámetro. Los mismos discos, cubreobjetos e implantes sin recubrir fueron utilizados como control para todos los ensayos.

2.1. Rugosidad

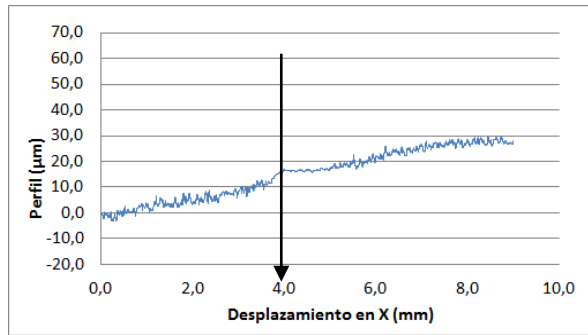
Para la caracterización de la topografía de los recubrimientos, se realizó una medida de la rugosidad mediante perfilometría, comparando los datos obtenidos con el Control, para determinar en qué medida la adición de cada recubrimiento afectaba a la rugosidad heterogénea de los discos de titanio. Del ensayo de perfilometría se obtuvieron las gráficas que se muestran a continuación (Gráfica 4) en las cuales, las medidas a la izquierda de la flecha pertenecen a la topografía del titanio y las medidas a la derecha de la flecha al recubrimiento.



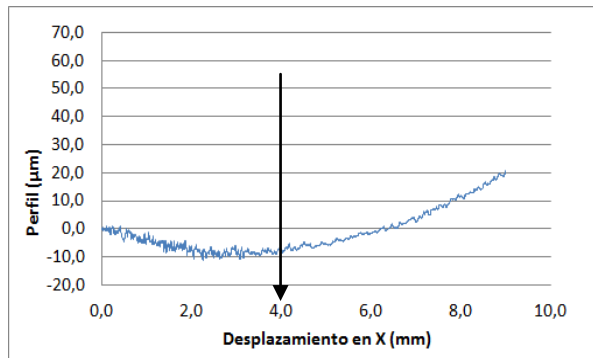
MTMOS



GPTMS



70MTMOS:30TEOS



50MTMOS:50GPTMS

Gráfica 4. Perfil de línea de la superficie de los recubrimientos (de arriba abajo) puros MTMOS y GPTMS y de los sistemas binarios 7M3T y 5M5G (a la izquierda de la flecha) con sus correspondientes Controles (a la derecha de la flecha).

De los recubrimientos puros, el GPTMS fue el precursor que mayor efecto tuvo sobre la rugosidad del titanio, haciendo que ésta prácticamente desapareciera (disminución del 74,1 %). En caso de combinar GPTMS y MTMOS al 50 %, la rugosidad presentó una disminución significativa, si bien menor que en el caso anterior (disminución del 44,6 %). La reducción de rugosidad provocada por el MTMOS fue mucho más limitada que en los dos casos anteriores limitándose al 24,2 %. Finalmente, de todas las formulaciones estudiadas, la formulación 7M3T fue la que menor cambio provocó en la topografía del titanio.

Los datos numéricos derivados de estas gráficas se muestran en la Tabla 16 en forma de porcentaje de variación de rugosidad entre cada recubrimiento y el Control.

Recubrimiento	Variación de la rugosidad entre el recubrimiento y el control
MTMOS	-24,2%
GPTMS	-74,1%
7M3T	-16,6%
5M5G	-44,6%

Tabla 16. Porcentaje de variación de la rugosidad, medida con el perfilómetro, entre cada tipo de recubrimiento y el control.

Este efecto sobre la superficie granallada del titanio se pudo observar mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 52).

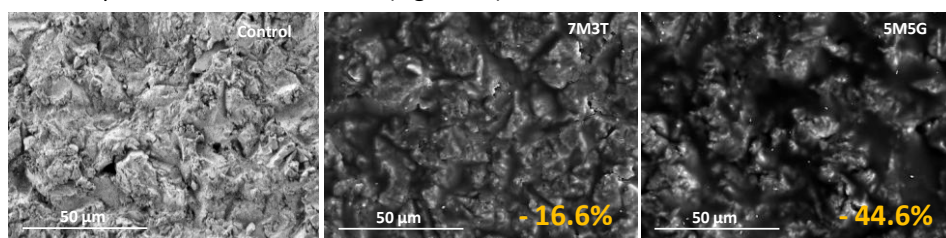


Figura 52. Imágenes de SEM de la superficie de discos de titanio (izquierda) recubiertos con el material 7M3T (centro) y 5M5G (derecha) y el porcentaje de disminución de la rugosidad del titanio que inducen los recubrimientos.

2.2. Hidrofilia

Para el estudio de la mojabilidad de los recubrimientos, se midió el ángulo de contacto formado por una gota de agua sobre las distintas superficies de los recubrimientos y el Control. Los discos fueron recubiertos sólo a la mitad para poder tomar los valores en el recubrimiento y el titanio en la misma muestra. Para cada zona se tomaron dos medidas (R; derecha e L; izquierda) y se realizaron tres réplicas para cada recubrimiento. Los valores de ángulo de contacto obtenidos para los distintos materiales indicaron un comportamiento más hidrófobo para el titanio, seguido del recubrimiento 5M5G y tras él, el 7M3T con el comportamiento más hidrófilo de todos (Tabla 17).

	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
	Control		Recubrimiento		Control		Recubrimiento		Control		Recubrimiento	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
7M3T	80,7	81,6	59,2	60,8	88,3	88,5	66,0	66,5	82	82,8	65,5	68,6
5M5G	83,8	82,6	67,5	67,8	86,7	86,8	70,5	68,9	84,1	83,9	68,3	68

Tabla 17. Resultados del ensayo de ángulo de contacto de los recubrimientos 7M3T y 5M5G y sus respectivos Controles. En cada disco se realizaron dos medidas por zona (Control o recubrimiento), una derecha (R, del inglés *right*) y una izquierda (L, del inglés *left*).

Todos los materiales mostraron diferencias significativas entre sí (7M3T-5M5G $p = 0,025$; 5M5G-Control $p = 0,001$; 7M3T-Control $p = 0,001$), como se indica en la Tabla 18.

Recubrimiento	Valores de hidrofilia (°)
7M3T	64,43 ± 3,63
5M5G	* 68,50 ± 1,09
Control	84,32 ± 2,65

Tabla 18. Medias y desviación estándar de los valores de ángulo de contacto.

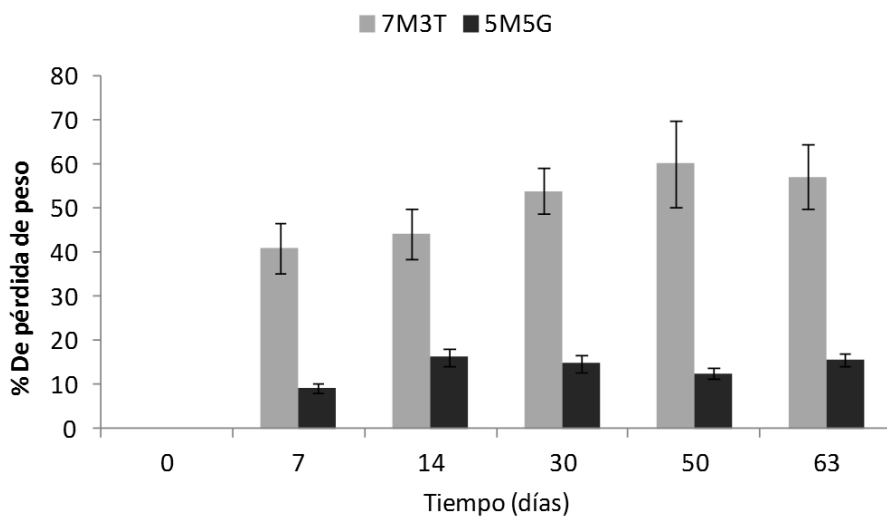
Según Salzman [238], los valores de ángulo de contacto que favorecen la adhesión celular se encuentran en el entorno de 70 °, ajustándose a este valor ambos recubrimientos.

2.3. Degradación

La degradación de los recubrimientos fue registrada por porcentaje (%) de pérdida de peso, tras cumplir cada uno de los periodos de toma de datos establecidos, en referencia al peso inicial a tiempo cero.

Ambos recubrimientos mostraron una degradación hidrolítica inicial muy rápida, que se estabilizó, siendo a todos los tiempos mayor para 7M3T. El recubrimiento 7M3T perdió *in vitro* casi la mitad de su peso durante la primera semana de ensayo, después aumentó su degradación pero a una menor velocidad, sin mostrar, no obstante, diferencias con el resto de periodos de ensayo. Sin embargo, el material 5M5G tan sólo degradó el 10% de su peso en la primera semana y durante el resto de periodos no aumentó demasiado esta pérdida inicial (

Gráfica 5).



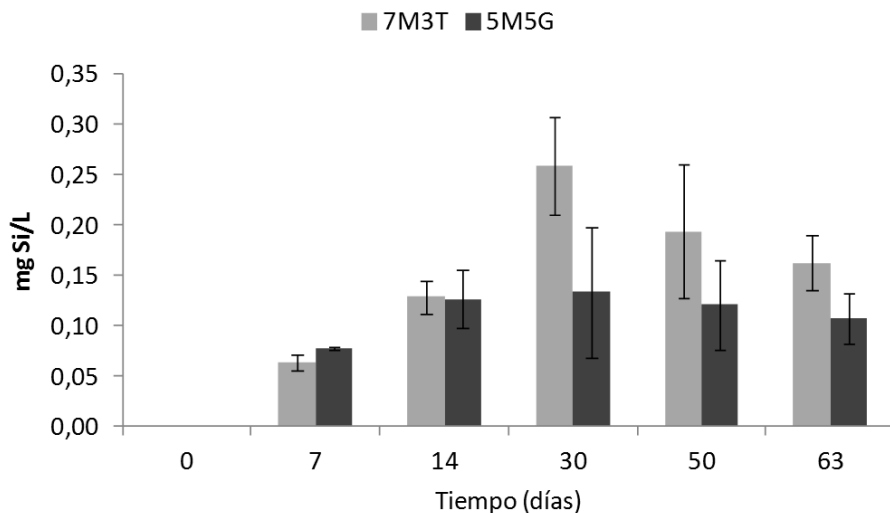
Gráfica 5. Datos de porcentaje (%) de pérdida de peso respecto al valor inicial para los materiales 7M3T y 5M5G.

2.4. Liberación

La degradación hidrolítica de los recubrimientos sol-gel libera compuestos de silicio, ácido ortosilícico en su mayoría, lo que le otorga bioactividad a estos materiales. Tras estudiar la degradación de estos recubrimientos, se procedió a estudiar la liberación de silicio asociada a ésta.

Cubreobjetos de vidrio recubiertos con las distintas formulaciones fueron sumergidos en agua pura durante distintos periodos de estudio, detectando al final de éstos la cantidad de silicio (mg Si / L) disuelta mediante espectroscopia.

Ambos materiales presentaron mayores valores de liberación de silicio a 30 y 50 días, y aunque los valores para 7M3T se mostraron mayores que para 5M5G. El recubrimiento 7M3T alcanzó su máximo a 30 días, tras lo cual la liberación descendió con el tiempo. Lo mismo sucedió, aunque no tan evidente, con 5M5G, cuyos valores desde 14 a 63 días fueron muy similares como se puede observar en la Gráfica 7.



Gráfica 6. Datos de liberación de silicio para los materiales 7M3T y 5M5G.

La mayor liberación para 7M3T ocurrió tras un mes de ensayo, disminuyendo con el tiempo aunque aumentara la degradación del recubrimiento. Para 5M5G los valores de liberación fueron directamente proporcionales a la tasa de degradación.

2.5. Adherencia al sustrato

Una buena adherencia del recubrimiento al sustrato al cual recubre es imprescindible al tratarse de implantes óseos, puesto que durante el proceso quirúrgico de implantación, éste debe soportar fuerzas de cizalladura que se producen debido al enroscado del implante en el defecto óseo generado. A fin de evaluar la resistencia de los recubrimientos, se implantaron *ex vivo* prótesis recubiertas con las diferentes formulaciones en rodilla de cerdo, siguiendo el proceso quirúrgico de implantación.

Los recubrimientos resistieron el proceso de implantación como se muestra en las imágenes de SEM y el espectro EDX de la Figura 53, mostrando una correcta adherencia al sustrato, ya que los recubrimientos permanecieron intactos.

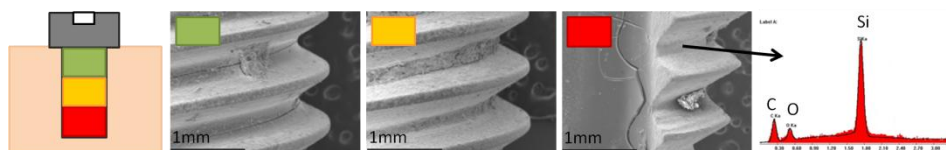


Figura 53. Imágenes de SEM que muestran que los recubrimientos resisten al proceso de implantación *ex vivo* en cada una de las partes del implante; proximal (verde), media (amarillo) y distal (rojo) (esquema, izquierda), puesto que se detecta silicio sobre la superficie de los implantes (espectro EDX, derecha).

En este caso los recubrimientos no sólo resistieron el proceso de implantación sino también el desenroscado posterior para extraer la prótesis.

3. Caracterización biológica

Una vez evaluadas las características físico-químicas de los recubrimientos, se procedió a caracterizar cómo éstas influían en el comportamiento celular de preosteoblastos en cultivo y sobre los tejidos vivos.

Para determinar el comportamiento celular inducido por los recubrimientos, se realizaron ensayos de citotoxicidad, adhesión, proliferación y diferenciación. Para determinar el comportamiento inducido por los diferentes recubrimientos sobre los tejidos vivos, se implantaron prótesis radiculares recubiertas con las distintas formulaciones utilizando el modelo animal de osteointegración en tibia de conejo.

Para la caracterización biológica solamente se empleó, como soporte de los recubrimientos, titanio puro comercial grado 4 con tratamiento superficial ADS®. Este titanio sirvió como soporte de ensayo en forma de discos (iguales a los ya empleados en la caracterización físico-química), para los ensayos *in vitro*, y en forma de prótesis radiculares comerciales (modelo GMI® Frontier de dimensiones anteriormente mencionadas), para los ensayos *in vivo*. Ambos sustratos fueron facilitados por la empresa Ilerimplant S.L. Los mismos discos e implantes sin recubrir fueron utilizados como control para todos los ensayos.

3.1. Evaluación biológica sobre cultivo celular

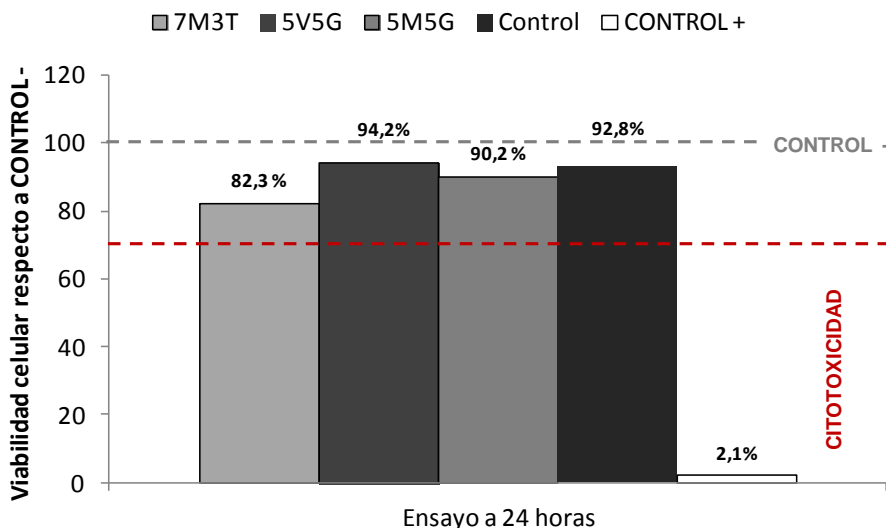
Con el objetivo de determinar cómo afectan los distintos recubrimientos al comportamiento de preosteoblastos, se realizaron ensayos de citotoxicidad y viabilidad, adhesión, proliferación y diferenciación.

3.1.1. Citotoxicidad por extracto

Según norma, el primer requisito que debe cumplir un biomaterial en desarrollo, que vaya a estar en contacto con el interior del organismo, es el de no ser citotóxico (ISO 10995-5). Por ello, con el objetivo de conocer los posibles efectos tóxicos de los nuevos recubrimientos sobre los preosteoblastos, se cuantificó el porcentaje de viabilidad celular respecto al Control – para citotoxicidad (Thermanox®) tras veinticuatro horas de incubación celular con el producto de extracción de los materiales.

En la Gráfica 7 se muestran los porcentajes de viabilidad celular respecto al Control – para citotoxicidad (Thermanox®), medidos por densidad óptica resultante del ensayo con MTS (protocolo descrito en el Capítulo 3).

Ninguno de los recubrimientos seleccionados demostró tener ningún efecto tóxico sobre los preosteoblastos, ya que todos ellos indujeron una viabilidad mayor del 70 % respecto al Control –, tal y como establece la norma (Gráfica 7).



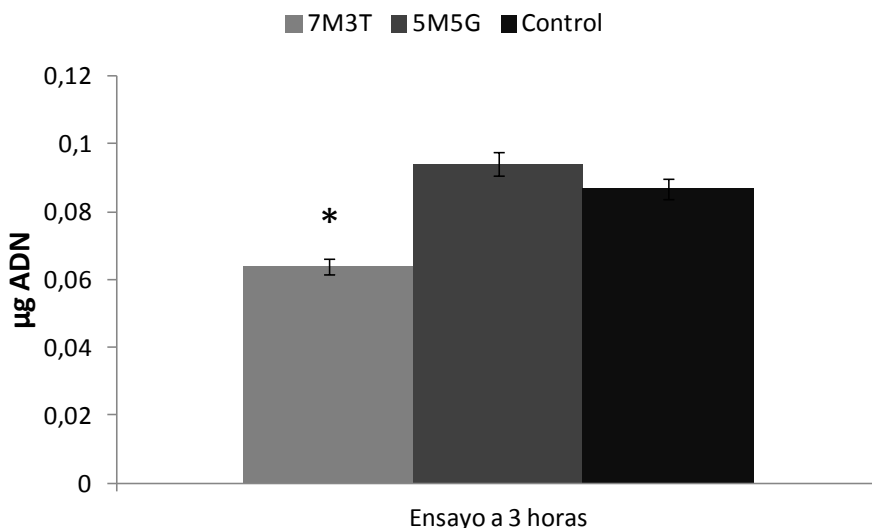
Gráfica 7. Datos de porcentaje de viabilidad celular respecto al CONTROL – (Thermanox®) para los recubrimientos 7M3T, 5V5G y 5M5G y para el titanio (Control).

3.1.2. Adhesión

Para determinar la capacidad de los recubrimientos de inducir la adhesión de los preosteoblastos sobre su superficie, se realizó un ensayo de adhesión mediante MTS (protocolo descrito en el Capítulo 3) y se observó la morfología celular sobre la superficie de los recubrimientos mediante SEM.

En la Gráfica 8 se muestran los valores obtenidos para la cuantificación de ADN de preosteoblastos, expresada como μg de ADN, tras 3 horas de incubación.

Como se puede observar, la adhesión celular fue mayor para el recubrimiento 5M5G, quizá debido a que sus valores de ángulo de contacto se acercaron al óptimo valor de hidrofilia, de 70° comentado anteriormente, para la adhesión celular. Los valores de adhesión para el Control fueron menores que para 5M5G, aunque no se encontraron diferencias estadísticas entre ellos ($p = 0,081$). Los menores datos registrados fueron para el recubrimiento 7M3T, encontraron diferencias estadísticamente significativas con 5M5G ($p = 0,000$) y con el Control ($p = 0,000$).



Gráfica 8. Ensayo de adhesión de preosteoblastos sobre los recubrimientos seleccionados y el Control

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido mostraron una adhesión celular algo diferente entre los recubrimientos y el Control (Figura 54). Mientras que, en el caso de titanio recubierto, los osteoblastos presentaron una adhesión por sus extremos mediante escasos filopodios, la morfología del citoesqueleto de los osteoblastos en cultivo sobre el titanio se mostró más estrellada, con mayor número de anclajes al sustrato.

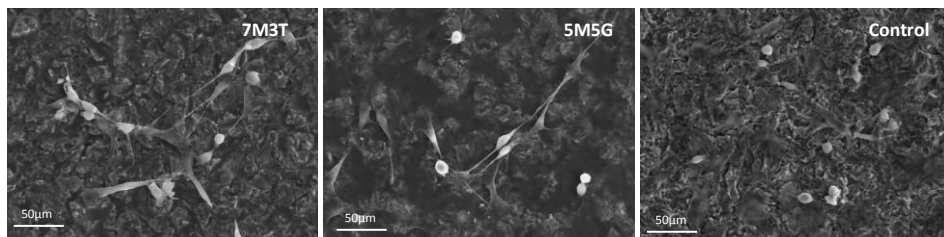


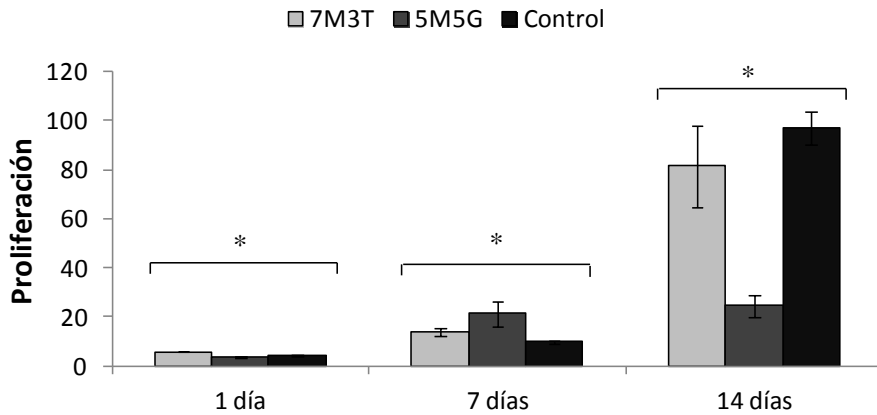
Figura 54. Imágenes de SEM de adhesión osteoblástica a 3 horas sobre los recubrimientos seleccionados (7M3T a la izquierda, 5M5G al centro) y el Control (derecha).

3.1.3. Proliferación

La determinación de cómo afectaron las distintas formulaciones a la proliferación celular, se realizó mediante cuantificación de ADN total de cultivos de 1, 7 y 14 días.

En la Gráfica 9 se muestran los valores obtenidos para la cuantificación de la proliferación de preosteoblastos en cada periodo de ensayo (1, 7 y 14 días) en referencia a la adhesión celular inicial (a 3 horas) días, como indicador de la proliferación celular.

Se pudieron observar diferencias tras un día de incubación para todos los materiales ($p = 0,000$ para todas las comparaciones entre materiales). Tras siete días de ensayo, los valores de proliferación fueron significativamente mayores para 5M5G, seguido por 7M3T y por último el Control (5M5G-7M3T $p = 0,000$; 5M5G-Control $p = 0,003$; 7M3T-Control $p = 0,000$). Al finalizar el ensayo, observamos cómo el titanio presentaba valores mayores de proliferación que 7M3T, seguido de 7M3T y, finalmente con un valor similar al de 7 días de incubación, 5M5G ($p = 0,000$ para todas las comparaciones entre materiales). Todos los materiales mostraron diferencias entre los distintos periodos de estudio ($p = 0,000$ entre 1-7, 7-14 y 1-14 días para 7M3T y el Control y, entre 1-7 y 1-14 días, para el recubrimiento 5M5G) a excepción del material 5M5G que presentó valores muy similares tras una y dos semanas de incubación ($p = 0,122$).



Gráfica 9. Ensayo de proliferación de preosteoblastos sobre los recubrimientos 7M3T y 5M5G y el Control.

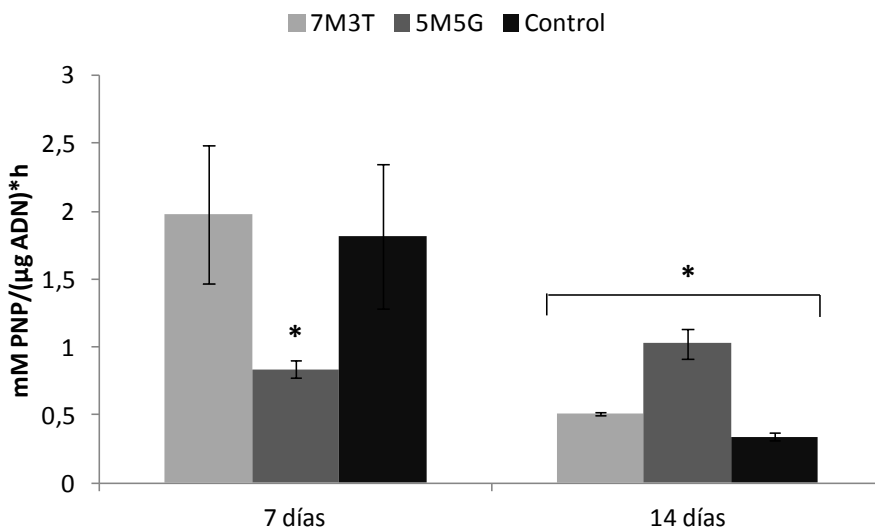
3.1.4. Diferenciación

La capacidad de los recubrimientos para inducir la diferenciación osteoblástica fue determinada por la cuantificación de la actividad de alcalina fosfatasa (ALP) respecto a la población celular.

La Gráfica 10 representa la evolución de la diferenciación, obtenida como la fracción entre la actividad de la ALP y el valor de cantidad de ADN en el cultivo, para el control y los materiales 7M3T y 5M5G, expresada como mM NNP/ μ g ADN*h. La ALP es un indicador de diferenciación osteoblástico y su actividad es crucial para el inicio de la mineralización de la matriz extracelular.

El material 5M5G presentó valores similares de diferenciación a 7 y 14 días de cultivo, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,058$), sin

embargo 7M3T y el Control disminuyeron significativamente tras dos semanas de incubación (7-14 días para Control $p=0,009$ y para 7M3T $p=0,037$). Durante la primera semana (ANOVA $p=0,033$), 5M5G fue el que menores valores presentó, superado por 7M3T ($p=0,017$) y el Control ($p=0,03$), los cuales no mostraron diferencias significativas entre sí ($p=0,065$). Sin embargo, los valores de 5M5G a dos semanas (ANOVA $p=0,000$) fueron significativamente mayores puesto que los valores de diferenciación inducida por 7M3T (5M5G-7M3T $p=0,000$) y el Control (5M5G-Control $p=0,000$) decayeron. La tasa de mineralización en el caso del Control fue la menor encontrada a 14 días de cultivo (5M5G-Control $p=0,000$ y 7M3T-Control $p=0,021$).



Gráfica 10. Ensayo de diferenciación de los recubrimientos seleccionados y el Control.

Con los datos recabados hasta este punto, podemos decir, a modo de resumen, que el recubrimiento 5M5G, fue el que más redujo la topografía granallada del titanio, presentando un grado de hidrofilia cercano al óptimo para adhesión celular, no indujo toxicidad celular pero sí una mayor adhesión inicial y una mayor diferenciación de osteoblastos a dos semanas. El recubrimiento 7M3T mostró un comportamiento celular más similar al titanio, aunque la adhesión inicial al recubrimiento fue menor y su tasa de mineralización levemente superior a 14 días (también a 7 días pero sin significación estadística).









3.2. Evaluación biológica tras la implantación *in vivo*

Para estudiar los efectos que los recubrimientos podían tener sobre los tejidos vivos, se diseñó un estudio experimental *in vivo* de implantación en tibia de conejo, denominado **Fase de Caracterización I**. Las muestras obtenidas tras la implantación

fueron procesadas para obtener cortes histológicos que poder observar al microscopio para evaluar el carácter biocompatible y la capacidad de osteointegración de los diferentes recubrimientos respecto del Control, así como la degradación *in vivo* de las distintas formulaciones.

A continuación, en la Figura 55, se muestran los cortes histológicos obtenidos tras 1, 2, 4 y 8 semanas de implantación de las prótesis Control y las recubiertas con las formulaciones seleccionadas 7M3T, 5V5G y 5M5G.

Se puede observar la gran dispersión existente en referencia a la posición de implantación, encontrando en ocasiones prótesis completas dentro del espacio medular o prótesis implantadas con la zona de la cabeza fuera de la tibia sin contacto alguno con la cortical. Algunas de las prótesis fueron implantadas con su extremo apical en contacto con el endostio opuesto al lugar de implantación, ofreciendo una mayor estabilidad primaria al implante.

		Recubrimientos	Cortes de las muestras implantadas
1 semana	7M3T		
	5V5G		
	5M5G		
	Control		
2 semanas	7M3T		
	5V5G		
	5M5G		
	Control		

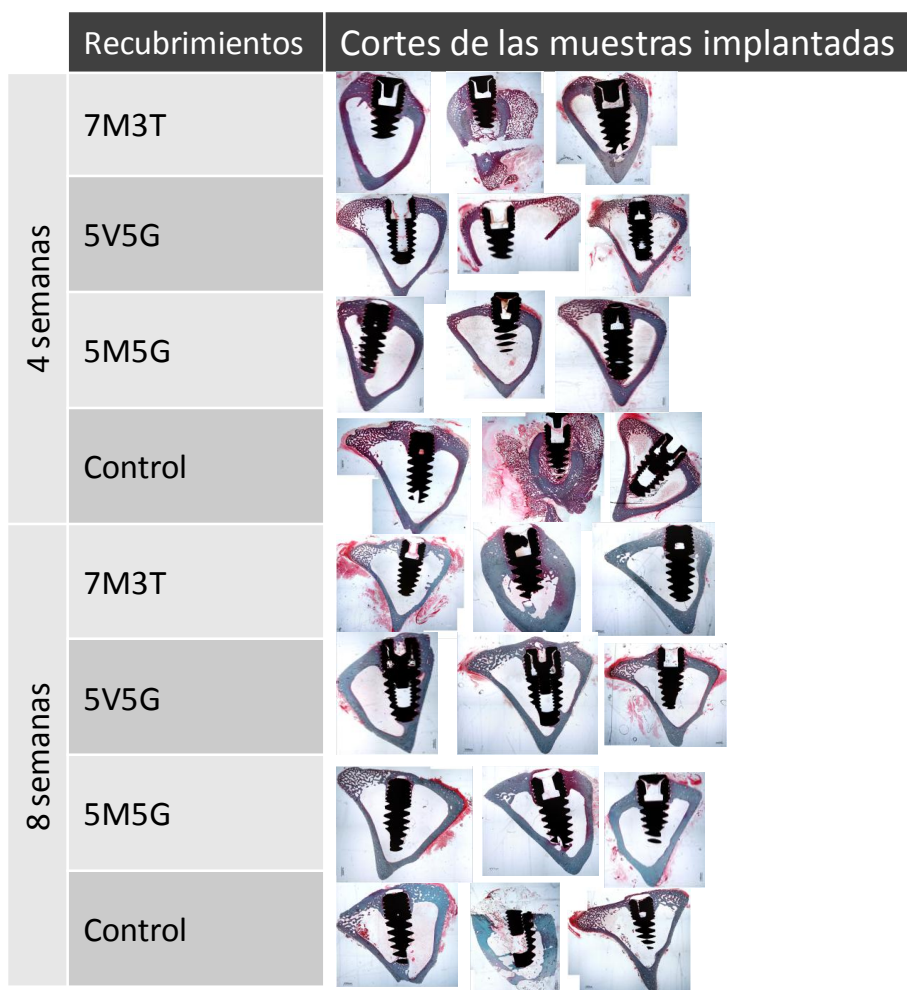


Figura 55. Cortes histológicos de las muestras implantadas (7M3T, 5V5G, 5M5G y Control) en tibia de conejo para los diferentes periodos de estudio (1, 2, 4 y 8 semanas) dentro de la **Fase de Caracterización I**.

3.2.1. Evaluación de la respuesta de reacción a cuerpo extraño

En el proceso de desarrollo de un biomaterial es esencial el estudio de los efectos inducidos sobre los tejidos adyacentes tras su implantación *in vivo*. Por ello se comprobó que los nuevos recubrimientos desarrollados no indujeran una reacción adversa sobre los tejidos. Esto se llevó a cabo mediante un estudio semicuantitativo basado en un sistema de puntuación de hasta 3 puntos de una serie de ítems relacionados con los efectos de los materiales sobre los tejidos circundantes a los implantes, tras la observación de los cortes histológicos con microscopio óptico.

De esta observación microscópica, además, se extrajo un estudio cualitativo de los principales eventos indicativos de la biocompatibilidad del sistema implante-huésped, tomando fotografías representativas de cada uno de los eventos mencionados para cada material y cada periodo de ensayo.

3.2.1.1. Estudio cualitativo de la respuesta de reacción a cuerpo extraño

Para el estudio cualitativo de la reacción de los tejidos a los recubrimientos implantados, se tuvieron en cuenta principalmente tres aspectos: el estado y evolución de la médula ósea, la presencia de células gigantes de reacción a cuerpo extraño y la formación y evolución de la cápsula fibrosa.

Médula

Pudimos observar cómo para el Control y el recubrimiento 7M3T la médula presentaba un buen estado tras una semana de implantación (mejor en 7M3T que en el Control), evolucionando hacia una médula traumatizada a dos semanas. Tras cuatro semanas se comenzó a ver una recuperación de la médula que se mantuvo a las ocho semanas de implantación (Figura 56 y Figura 57).

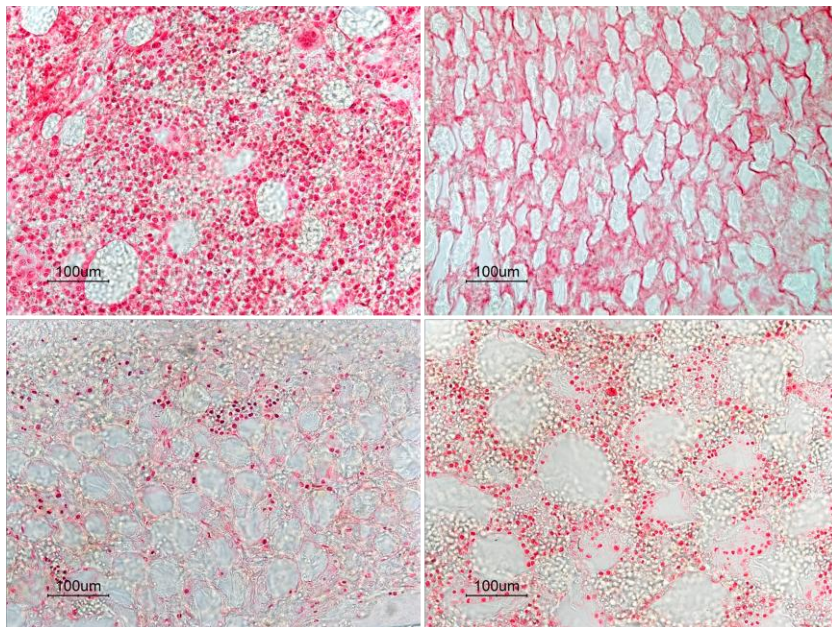


Figura 56. Estado de la médula ósea en el recubrimiento 7M3T; con aspecto normal tras 1 semana de implantación (arriba izquierda); médula aplásica con pérdida de arquitectura tras 2 semanas de implantación (arriba derecha); médula en proceso de recuperación de su arquitectura y carga celular tras 4 semanas de implantación (abajo izquierda); y médula en proceso de recuperación tras 8 semanas de implantación (abajo derecha).

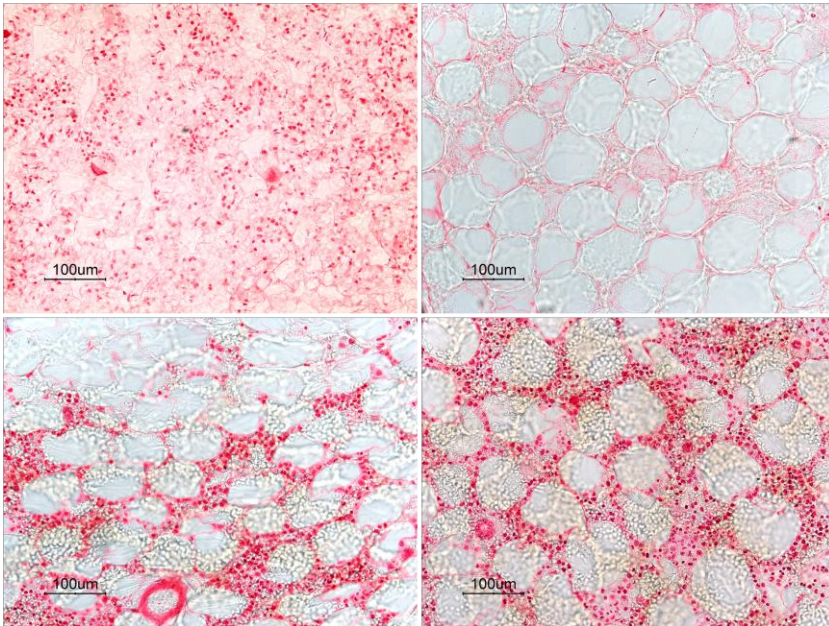


Figura 57. Estado de la médula ósea en el Control; con un aspecto un poco traumatizado tras 1 semana de implantación (arriba izquierda); mostrando una aplasia total tras 2 semanas de implantación (arriba derecha); recuperando la carga celular tras 4 semanas (abajo izquierda) y 8 semanas de implantación (abajo derecha).

Para los recubrimientos 5V5G y 5M5G la médula presentó un estado traumático desde la primera semana, que empeoró tras dos semanas de implantación, convirtiéndose en una médula aplásica. El intento, tras cuatro semanas, por mejorar su estado no perduró hasta las ocho semanas donde se pudo observar una médula muy traumatizada (Figura 58 y Figura 59).

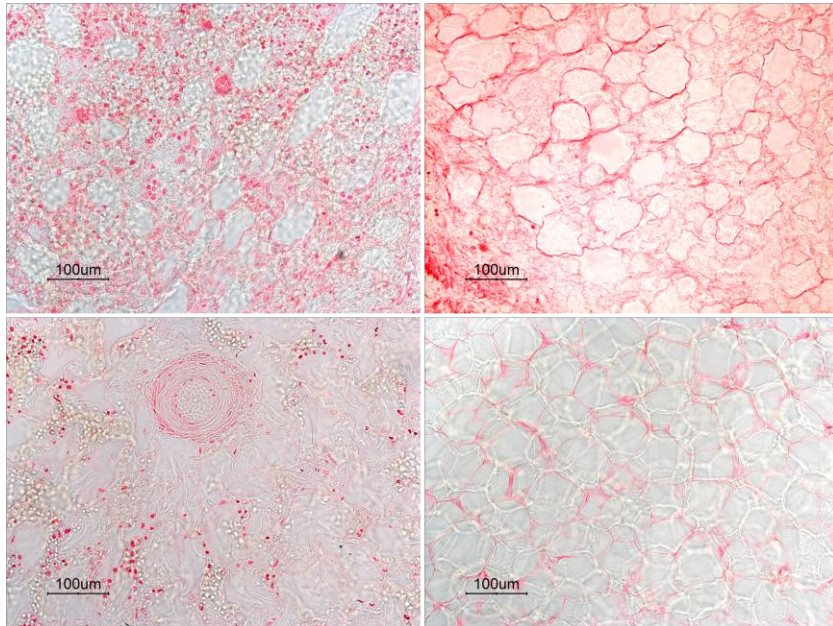


Figura 58. Estado de la médula ósea en el recubrimiento 5V5G; traumatizada tras 1 semana de implantación (arriba izquierda) con poco contenido adipocítico; totalmente aplásica y con pérdida de su estructura tras 2 semanas de implantación (arriba derecha); intento de recuperación tras 4 semanas de implantación (abajo izquierda); médula con recuperación de la arquitectura pero totalmente aplásica tras 8 semanas de la implantación (abajo derecha).

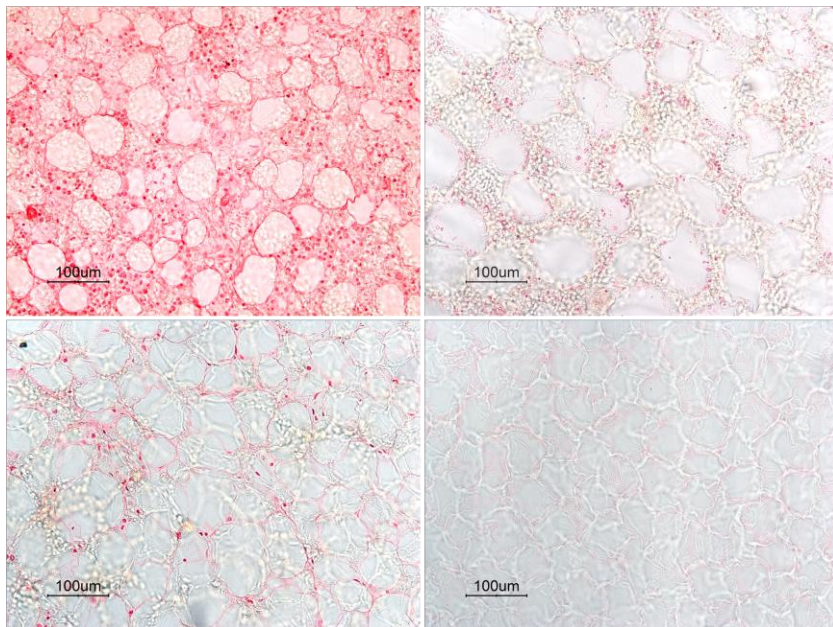


Figura 59. Estado de la médula ósea en el recubrimiento 5M5G; traumatizada tras 1 semana de implantación (arriba izquierda) y 2 semanas de implantación (arriba derecha) sin mucha pérdida de la arquitectura; intento de recuperación de la carga celular tras 4 semanas de
149

implantación (abajo izquierda); médula totalmente aplásica tras 8 semanas de la implantación (abajo derecha).

Así pues, 7M3T presentó un mejor estado de la médula ósea que el resto de los recubrimientos, consiguiendo una recuperación total de ésta al finalizar el periodo de estudio de 8 semanas. El recubrimiento 7M3T presentó un estado ligeramente mejor de la médula tras 1 semana de implantación, alcanzando tanto el Control como este recubrimiento la completa recuperación tras 8 semanas de implantación.

Células gigantes de reacción a cuerpo extraño

Tan sólo se observaron células de reacción a cuerpo extraño en contacto con el titanio y en contacto con el recubrimiento 7M3T (Figura 60). Sin embargo, el número de células observadas no supuso un problema de biocompatibilidad puesto que en ningún caso excedió a la respuesta fisiológica de reacción a cuerpo extraño.

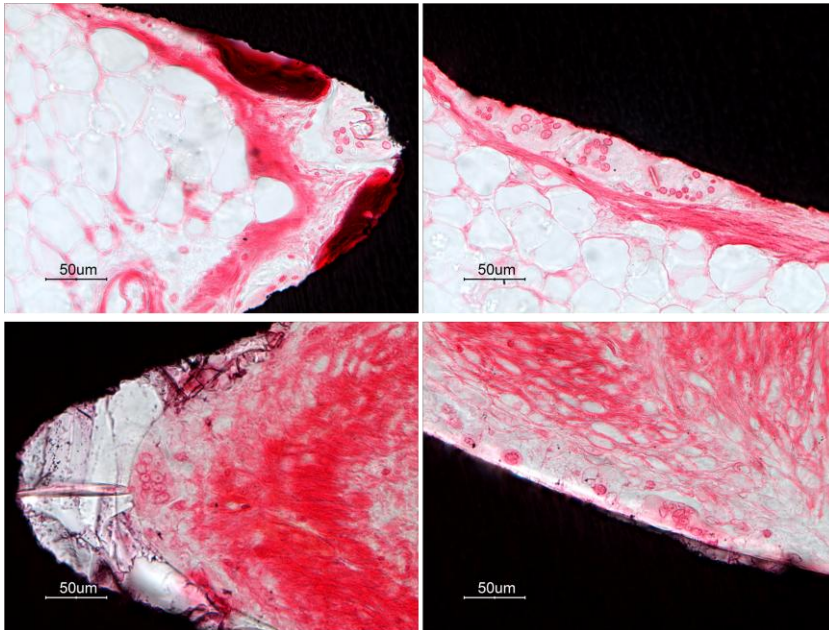


Figura 60. Células gigantes de reacción a cuerpo extraño encontradas en el Control tras 8 semanas (arriba) y en el recubrimiento 7M3T tras 2 semanas de implantación (abajo).

Cápsula fibrosa

Tanto el Control como el recubrimiento 7M3T indujeron la formación de una banda fibrosa extensa y laxa en zonas de contacto implante-médula. Tras dos semanas, el aspecto de esta cápsula fue muy parecido al encontrado para una semana de implantación, sin embargo con el tiempo se observó cómo esta banda se estrechaba y

densificaba en las zonas del implante en contacto con la médula (Figura 61 y Figura 62).

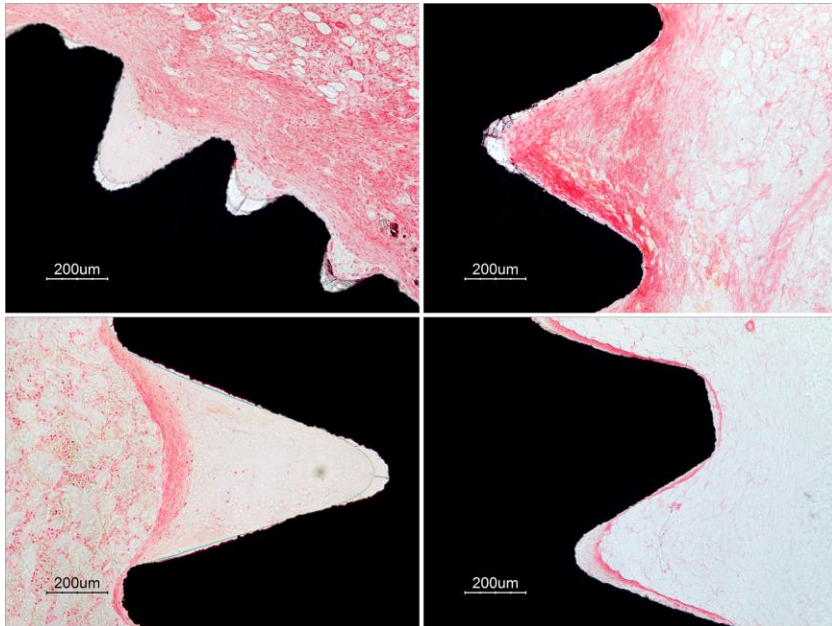


Figura 61. Evolución de la cápsula fibrosa para 7M3T; banda fibrosa extensa y laxa tras 1 semana de implantación (arriba izquierda); tras 2 semanas de implantación la banda fibrosa se va compactando (arriba derecha) y continúa haciéndolo hasta que tras 8 semanas de implantación (abajo) encontramos una banda estrecha y densa envolviendo el implante en zonas en contacto con la médula ósea.

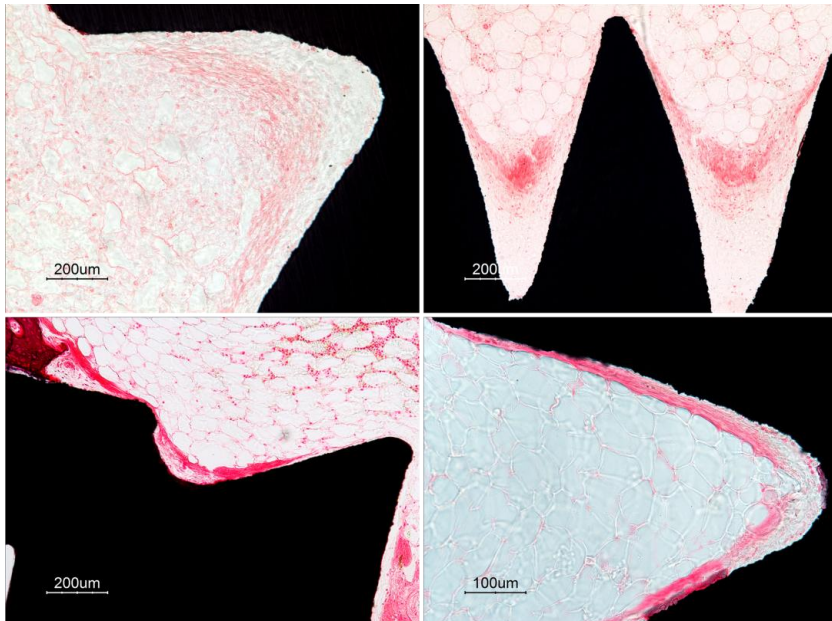


Figura 62. Evolución de la cápsula fibrosa para el Control; banda fibrosa extensa y laxa tras 1 semana de implantación (arriba izquierda); tras 2 semanas de implantación la médula se va densificando (arriba derecha) hasta transformarse en una fina y densa banda fibrosa observada tras 4 semanas (abajo izquierda) y 8 semanas de implantación (abajo derecha) en zonas del implante en contacto con la médula ósea.

Para los recubrimientos 5V5G y 5M5G el estado de la médula a 1 y 2 semanas fue similar al encontrado para el Control y 7M3T, sin embargo su evolución no fue la misma, ya que se observó una cápsula fibrosa más densa y evidente que en el caso anterior, y que no sólo se encontró en zonas del implante en contacto con la médula si no que también interpuesta entre el implante y el hueso trabecular (Figura 63 y Figura 64).

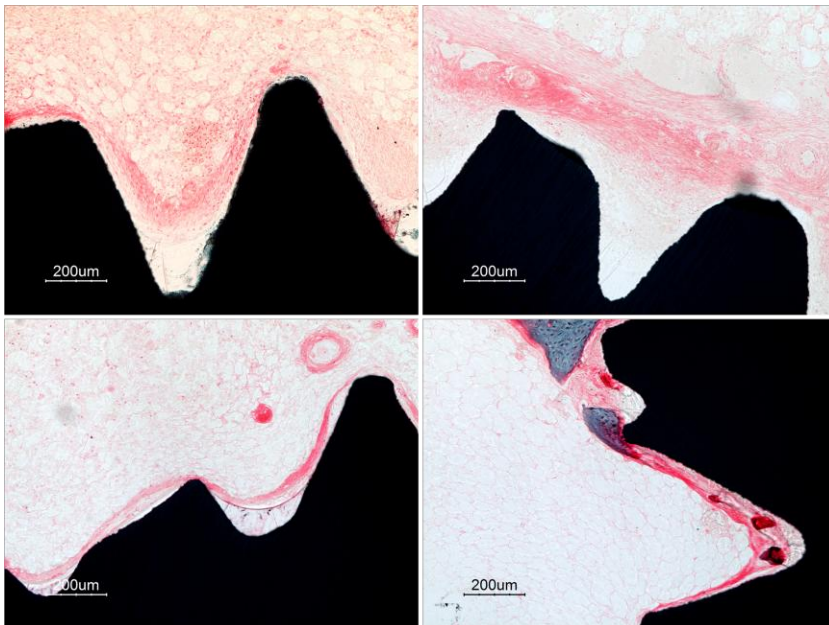


Figura 63. Evolución de la cápsula fibrosa para 5V5G; banda fibrosa laxa y densa observada tras 1 semana de implantación (arriba izquierda) que se mantiene tras 2 semanas de implantación (arriba derecha) y se va densificando con el tiempo hasta transformarse, tras 8 semanas de implantación (abajo), en una banda fibrosa muy densa que envuelve el implante.

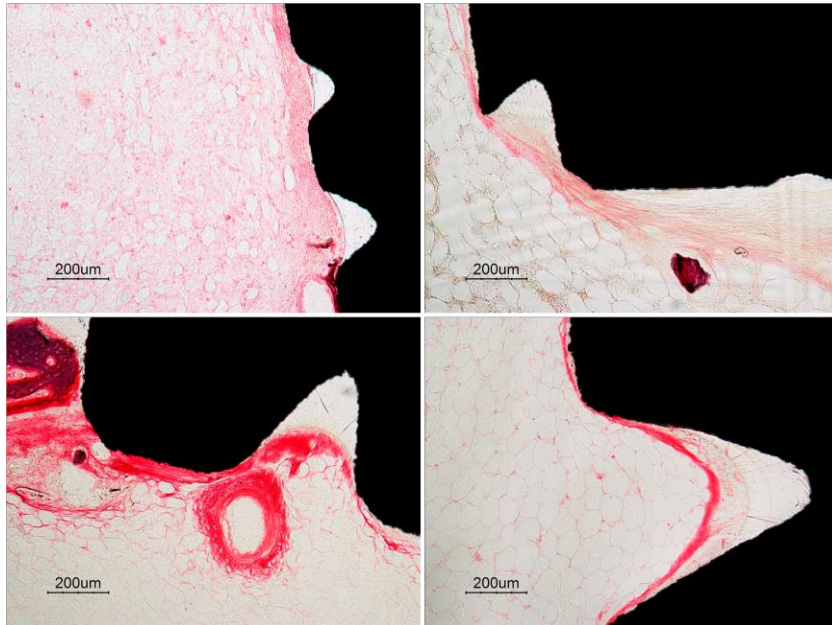


Figura 64. Evolución de la cápsula fibrosa para 5M5G; banda fibrosa laxa y densa observada tras 1 semana de implantación (arriba izquierda) que se mantiene tras 2 semanas de implantación (arriba derecha) y se va densificando tras 4 semanas de implantación (abajo izquierda), hasta transformarse, tras 8 semanas de implantación (abajo), en una banda fibrosa muy densa que envuelve el implante.

Por tanto, aunque al inicio las cápsulas formadas para todos los materiales fueron similares, evolucionaron de formas distintas. Para 5V5G y 5M5G la cápsula se densificó mucho formándose una banda fibrosa muy densa que envolvió el implante totalmente interponiéndose entre el implante y el hueso, cosa que no sucedió para el recubrimiento 7M3T y el Control.

3.2.1.2. Estudio semicuantitativo de la respuesta de reacción a cuerpo extraño

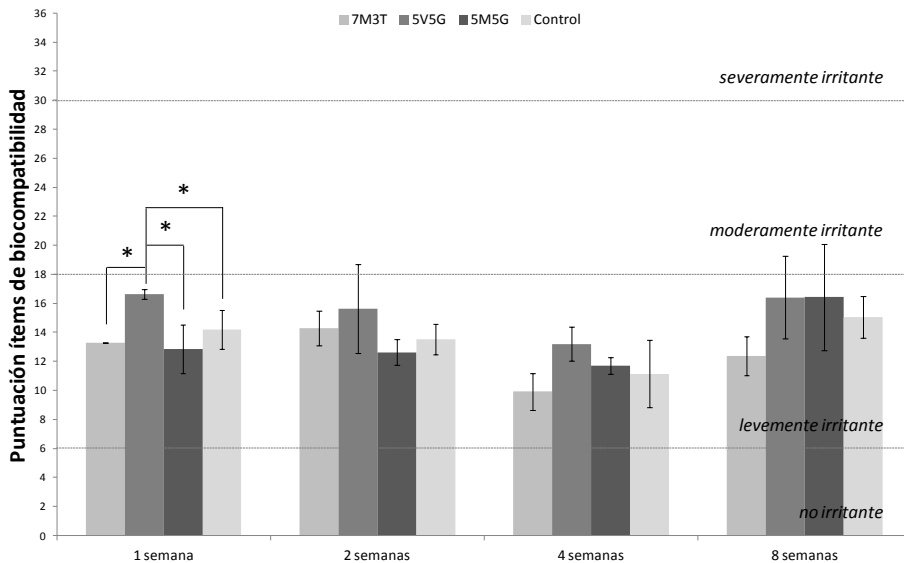
Mediante observación con microscopio óptico de los cortes histológicos de determinados ítems relacionados con la reacción de los tejidos a los recubrimientos, y su puntuación dentro de una escala de 0 a 3, se procedió a evaluar de forma semicuantitativa el carácter biocompatible de las nuevas formulaciones.

Los ítems relativos al carácter biocompatible de los sistemas implante-huésped de los recubrimientos seleccionados fueron; aplasia medular (1), pérdida de la arquitectura medular (2), estado medular en zonas alejadas del implante (3), ratio de adipocitos medulares (4), necrosis del hueso cortical (5), necrosis del hueso trabecular (6), presencia de células gigantes de reacción a cuerpo extraño (7), presencia de fibrosis/cápsula fibrosa en contacto con la médula (8), presencia de fibrosis/cápsula

fibrosa entre la cortical y el implante, entre el hueso trabecular y el implante (10), grado de densificación de la cápsula fibrosa (11) y neovascularización (12).

La Gráfica 11 muestra la puntuación conseguida para los recubrimientos 7M3T, 5V5G, 5M5G y el Control, para cada periodo de implantación.

Los resultados tras el estudio estadístico de los ítems de biocompatibilidad seleccionados demostraron que el recubrimiento 5V5G inducía mayores efectos adversos sobre los tejidos adyacentes que el resto de materiales y que el Control tras 1 semana de implantación (ANOVA $p = 0,007$; *Post hoc*: 5V5G-7M3T $p = 0,002$; 5V5G-5M5G $p = 0,003$; 5V5G-Control $p = 0,017$). Aunque el recubrimiento 7M3T presentó mejores valores que el Control a 4 y 8 semanas, estas diferencias no fueron significativas ya que ANOVA no mostró diferencias significativas entre los efectos inducidos por ningún material, incluido el Control, tras 2, 4 y 8 semanas de implantación (2 semanas $p = 0,274$; 4 semanas $p = 0,72$; 8 semanas $p = 0,238$).



Gráfica 11. Datos de la evaluación semicuantitativa de los ítems de biocompatibilidad de los recubrimientos 7M3T, 5V5G y 5M5G y del Control con los tejidos adyacentes tras la implantación.

De modo que, todos los sistemas con los implantes recubiertos presentaron un comportamiento similar al titanio sin recubrir, a excepción del 5V5G tras una semana de implantación. Los recubrimientos fueron, en general, clasificados como levemente irritantes, al igual que el titanio.

3.2.2. Osteointegración

Mediante observación, con microscopio óptico, de los cortes histológicos obtenidos en la primera fase de experimentación animal se evaluó la capacidad de osteointegración de los implantes recubiertos y Control.

Para alcanzar este objetivo se realizaron varios tipos de estudio: un **Estudio histológico** previo, en el que fueron observados determinados parámetros indicativos de osteointegración de forma cualitativa, y dos estudios histomorfométricos, en los que se cuantificaron algunos de esos parámetros (**Histomorfometría panorámica** e **Histomorfometría detallada**).

Los implantes con recubrimiento 7M3T y los implantes Control, sin recubrir, alcanzaron una osteointegración muy similar, aunque cualitativamente el recubrimiento 7M3T pareció mostrar una mayor osteointegración tras 1 y 2 semanas de implantación (Figura 65).

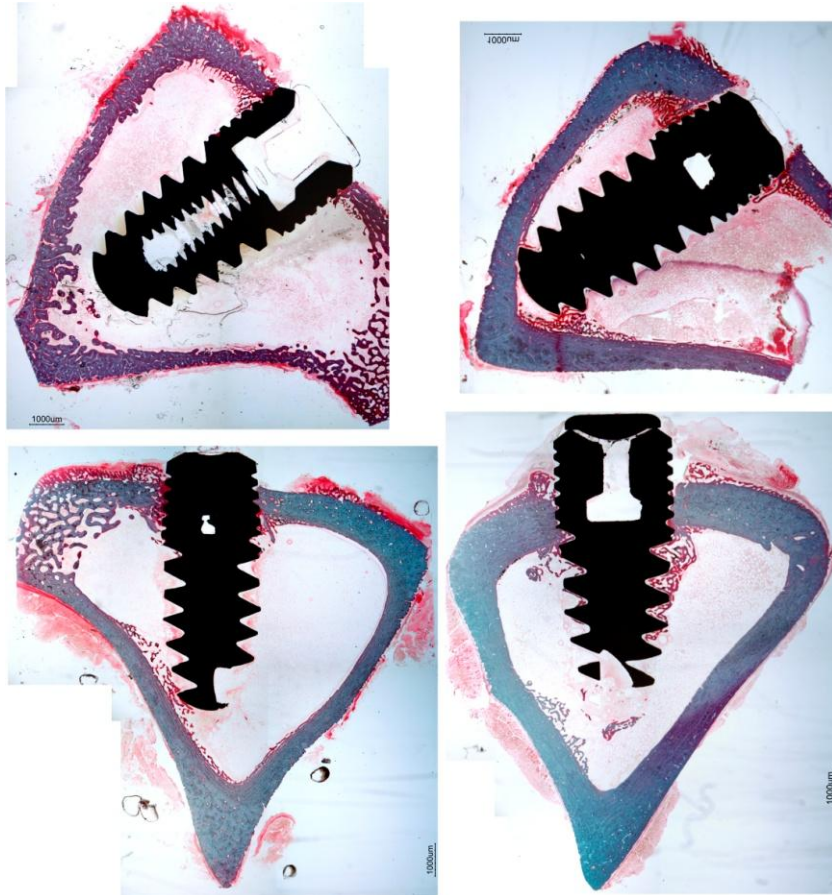


Figura 65. Imágenes de microscopía óptica del Control tras 1 semana (arriba izquierda), 7M3T tras 1 semana (arriba derecha), Control tras 2 semanas (abajo izquierda) y 7M3T tras 2 semanas (abajo derecha) de implantación.

Para todos los materiales evaluados pareció alcanzarse una osteointegración equiparable tras 8 semanas de implantación (Figura 66), con la salvedad de que para los recubrimientos 5V5G y 5M5G permaneció una fina cápsula fibrosa interpuesta entre el hueso y el recubrimiento, impidiendo el contacto directo del hueso con el implante.

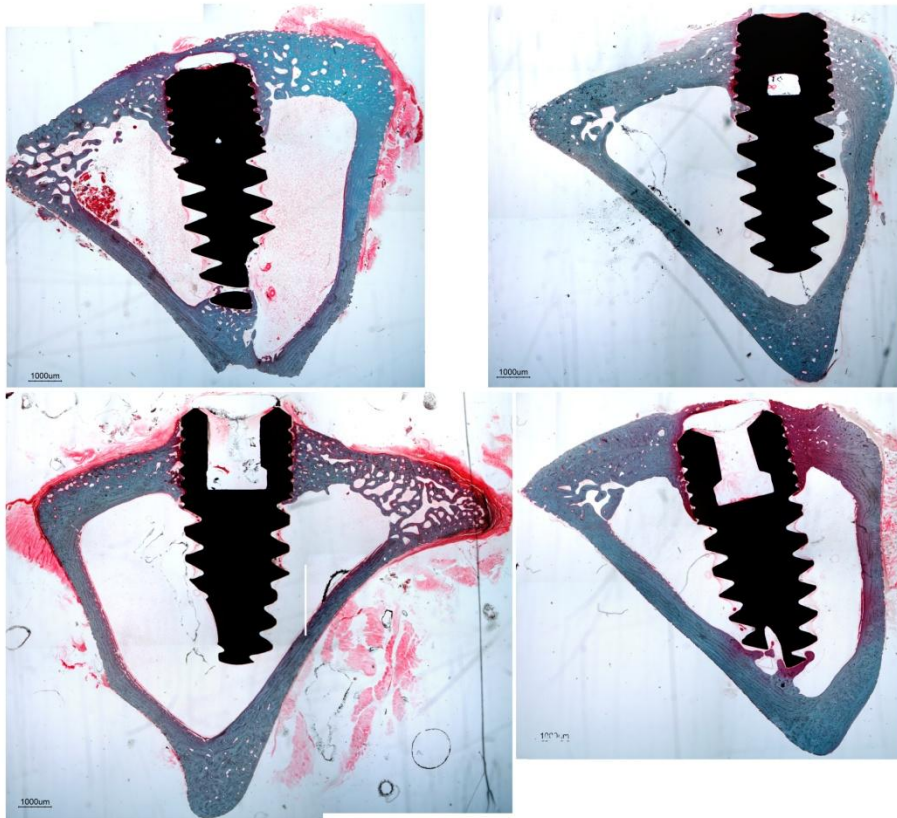


Figura 66. Imágenes de microscopía óptica del Control (arriba izquierda), 7M3T (arriba derecha), 5V5G (abajo izquierda) y 5M5G (abajo derecha) tras 8 semanas de implantación.

3.2.2.1. Estudio cualitativo de la osteointegración

En el estudio cualitativo de la osteointegración se tuvieron en cuenta diferentes parámetros como la osteointegración con la cortical, la osteointegración con el hueso trabecular y la activación osteoblástica.

Osteointegración de la cortical

El hueso cortical es con el que el implante establece la estabilidad en primer término, la cual, si es adecuada y suficiente, permitirá que tenga lugar la neoformación de hueso trabecular alrededor del implante, otorgándole la estabilidad biológica a largo plazo (estabilidad secundaria).

En pocos casos se consiguió la osteointegración completa del hueso cortical, debido a que en la gran mayoría de los casos se formó una cicatriz fibrosa intermedia, debida tal vez a la existencia de micromovimientos del implante por falta de suficiente estabilidad primaria debido al modelo de implantación. La osteointegración parcial de la cortical dependió por tanto, de la estabilidad alcanzada en un primer momento, afectando al grado de estabilidad secundaria que se podría llegar a alcanzar, no tanto del tipo de material en contacto con ésta.

Así pues, encontramos, tanto para el Control como para el recubrimiento 7M3T, corticales sin osteointegrar completamente a cualquier tiempo de ensayo (Figura 67 y Figura 68).

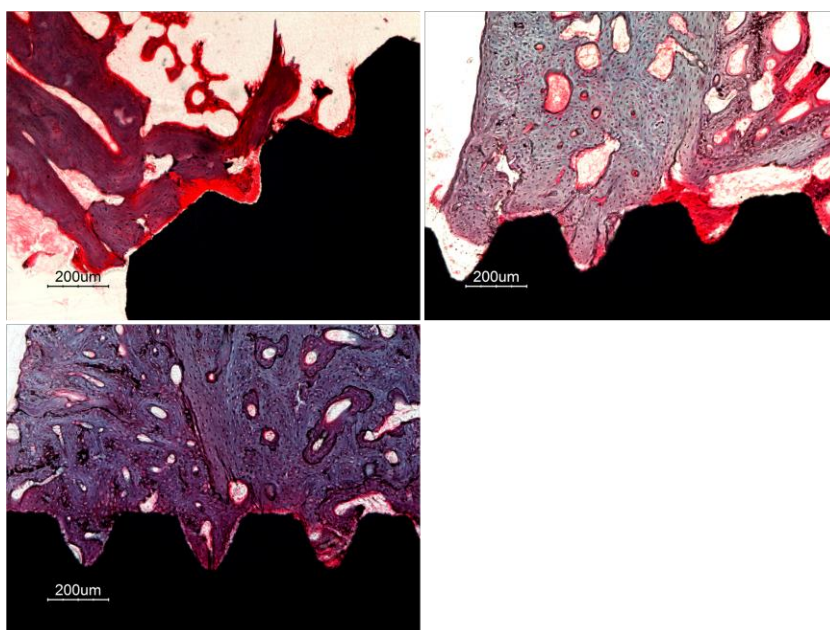


Figura 67. Osteointegración del hueso cortical para el Control tras 1 semana de implantación (arriba izquierda), 2 semanas de implantación (arriba derecha) y 4 semanas de implantación (abajo izquierda).

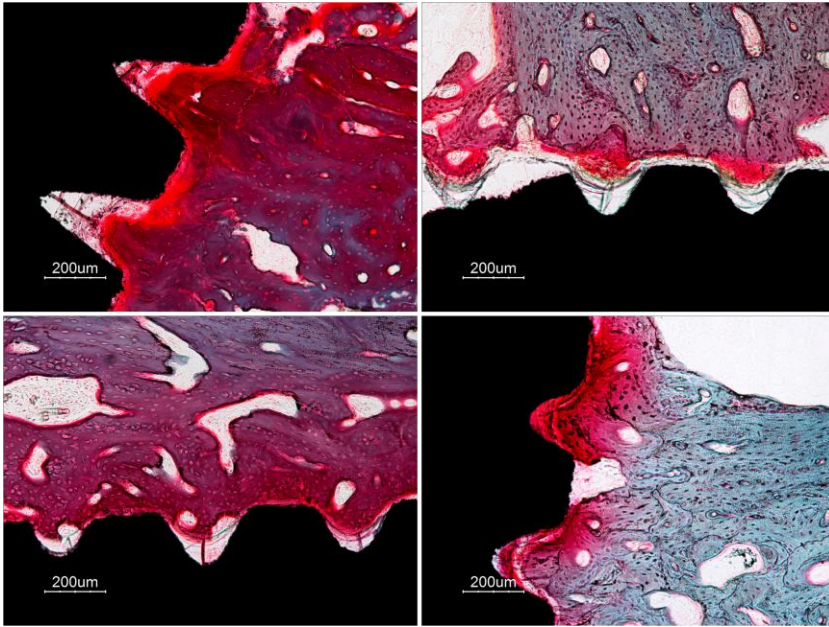


Figura 68. Osteointegración de la cortical para 7M3T tras 1 semana de implantación (arriba izquierda), 2 semanas de implantación (arriba derecha), 4 semanas de implantación (abajo izquierda) y 8 semanas de implantación (abajo derecha).

Para el caso de los recubrimientos 5V5G y 5M5G, encontramos corticales sin osteointegrar por completo, por la falta de estabilidad primaria del modelo de implantación. Sin embargo, como se demostrará más adelante, al no degradar los recubrimientos 5V5G y 5M5G, la osteointegración con la cortical de los implantes recubiertos con estas formulaciones fue más escasa que para 7M3T, que sí degradó, y que para el Control (Figura 69 y Figura 70).

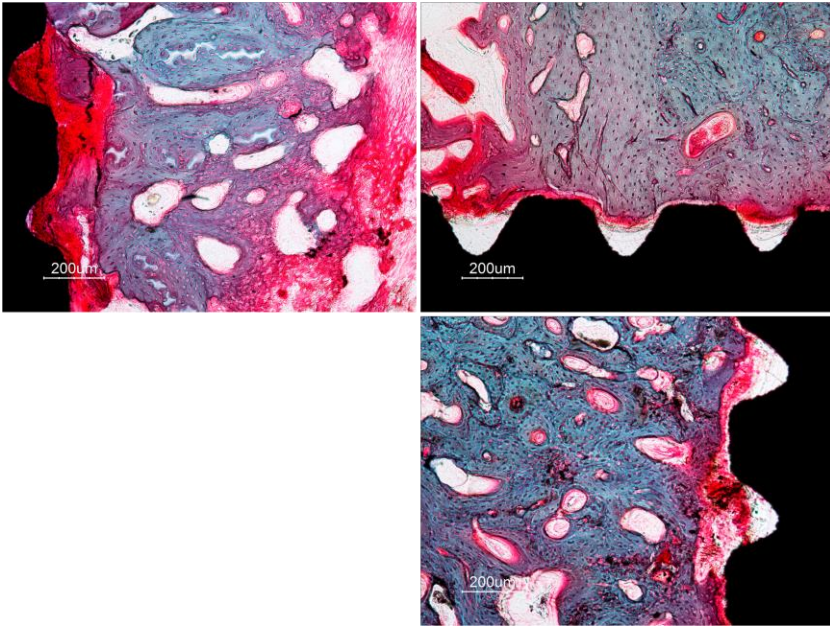


Figura 69. Osteointegración del hueso cortical para 5V5G tras 1 semana de implantación (arriba izquierda), 2 semanas de implantación (arriba derecha) y 8 semanas de implantación (abajo derecha).

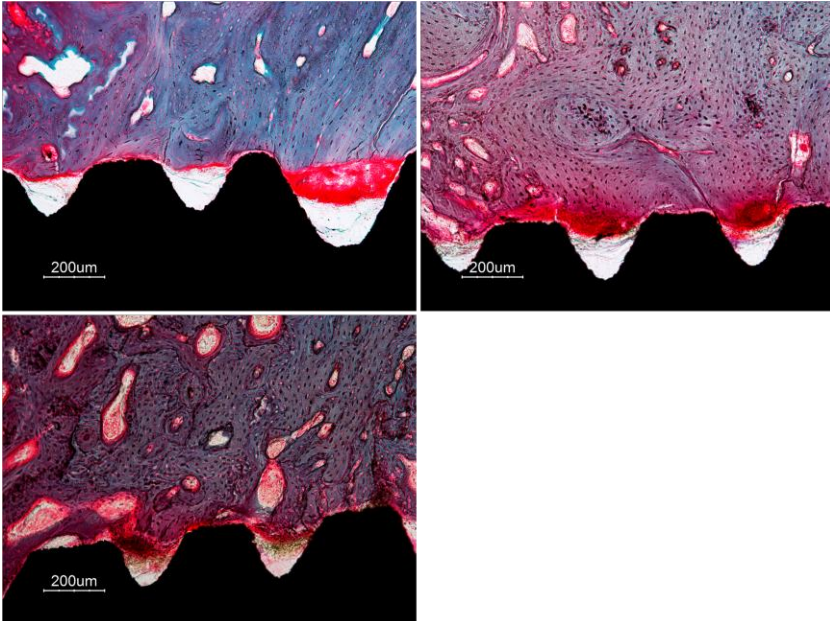


Figura 70. Osteointegración del hueso cortical para 5M5G tras 1 semana de implantación (arriba izquierda), 2 semanas de implantación (arriba derecha) y 4 semanas de implantación (abajo izquierda).

Como se ha indicado anteriormente, la formación de una cicatriz fibrosa interpuesta entre el hueso y el implante, con independencia de la naturaleza de la superficie, debido a la falta de estabilidad primaria, dificultó la osteointegración de las prótesis (Figura 71).

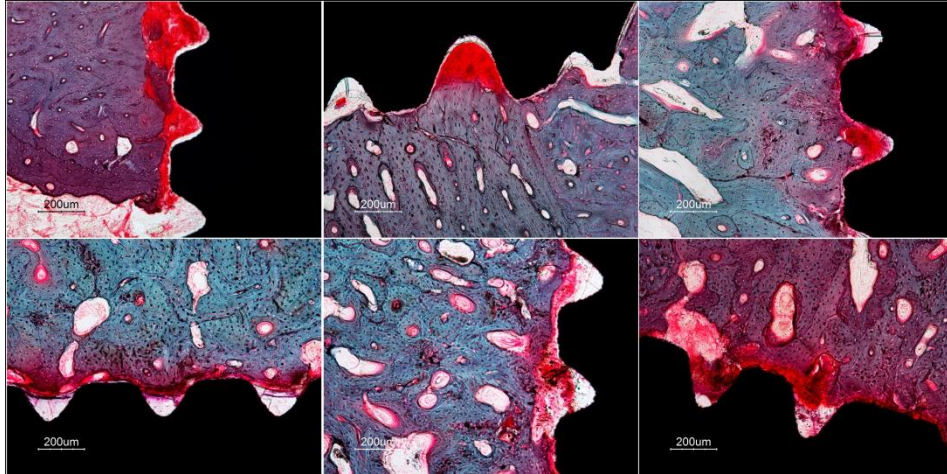


Figura 71. Cicatrices fibrosas entre el hueso cortical y el implante (rojo), encontradas en la mayoría de los casos para todos los materiales implantados; Control a 4 semanas de implantación (arriba izquierda); 7M3T a 4 semanas (arriba centro) y 8 semanas de implantación (arriba derecha); 5V5G a 8 semanas de implantación (abajo izquierda); y 5M5G tras 4 semanas de implantación (abajo centro y derecha).

Osteointegración en hueso trabecular

Como se comentó anteriormente, si se dan los factores que permiten una estabilidad primaria suficiente tendrá lugar la formación de nuevo hueso trabecular alrededor del implante que le dé la estabilidad a largo plazo con la que se habrá logrado el éxito de la implantación.

Durante la evaluación de la osteointegración del implante con el hueso trabecular, se observó que el Control y el recubrimiento 7M3T (Figura 72 y Figura 73) evolucionaron mejor en el tiempo, osteointegrando mejor debido a la ausencia de tejido fibroso interpuesto como el que fue encontrado en los recubrimientos 5V5G y 5M5G (Figura 74 y Figura 75).

En el caso de los implantes sin recubrir (Control), se observó hueso en contacto directo con el implante desde la primera semana de implantación debido a la osteogénesis por contacto, además de la formación de espículas activas (por osteogénesis a distancia desde el endostio) que fueron madurando con el tiempo hasta formar una red de trabéculas ocupando el espacio entre los valles del implante (Figura 72).

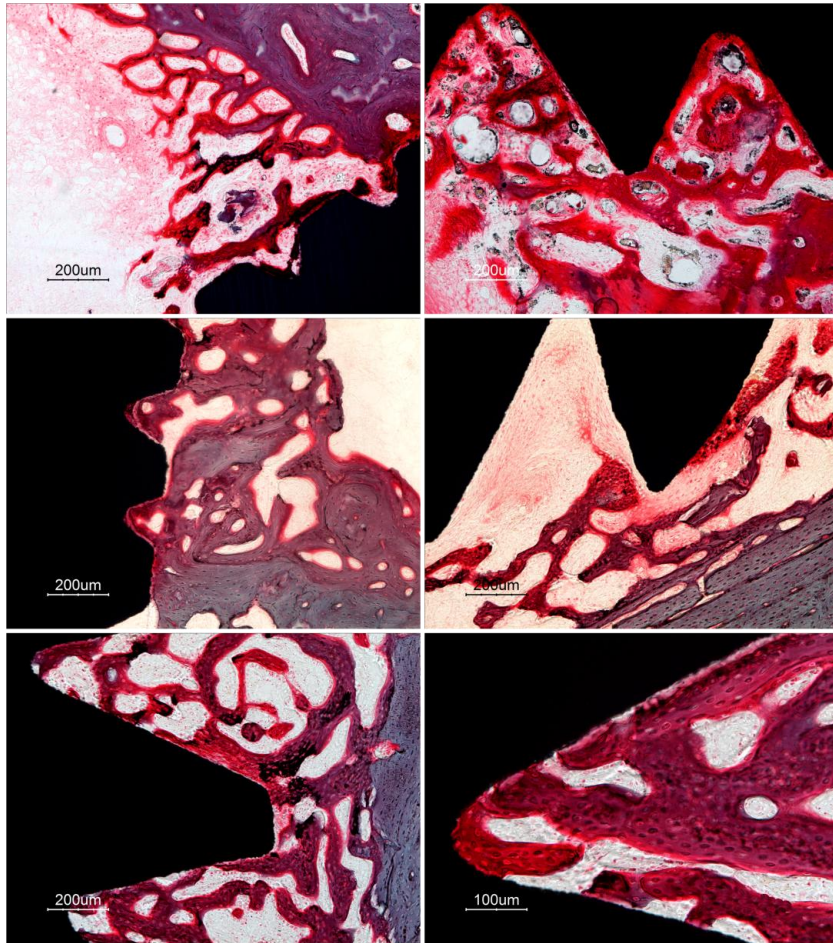


Figura 72. Osteointegración con el hueso trabecular para el Control; formación de espículas activas, por osteogénesis a distancia desde el endostio y por osteogénesis por contacto, tras 1 semana de implantación (arriba); trabéculas más maduras tras 2 semanas de implantación (centro); maduración de las trabéculas y ocupación de los valles tras 4 semanas de implantación (abajo).

Con el tiempo, el recubrimiento 7M3T fue degradando en las zonas próximas al hueso trabecular, de forma que tras 8 semanas de implantación se pudo observar que el recubrimiento 7M3T se había degradado por completo y nuevo hueso trabecular ocupaba su lugar en el fondo de los valles (Figura 73).

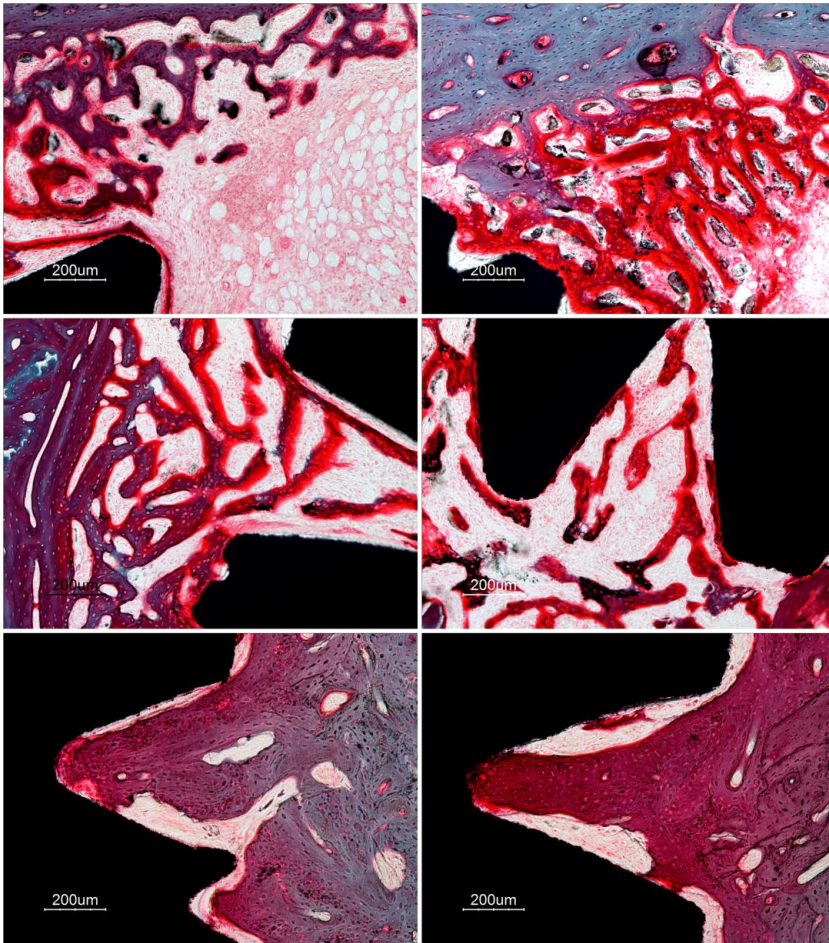


Figura 73. Osteointegración con el hueso trabecular para 7M3T; formación de espículas y trabéculas con gran activación osteoblástica, por osteogénesis a distancia desde el endostio, tras 1 semana de implantación (arriba y centro izquierda) y 2 semanas de implantación (centro derecha); formación de nuevas trabéculas maduras ocupando el lugar del recubrimiento totalmente degradado tras 8 semanas de implantación (abajo).

La escasez de activación osteoblástica y la formación de tejido fibroso interpuesto entre el recubrimiento y el hueso para 5V5G, no permitieron una completa osteointegración de las prótesis recubiertas con esta formulación (Figura 74).

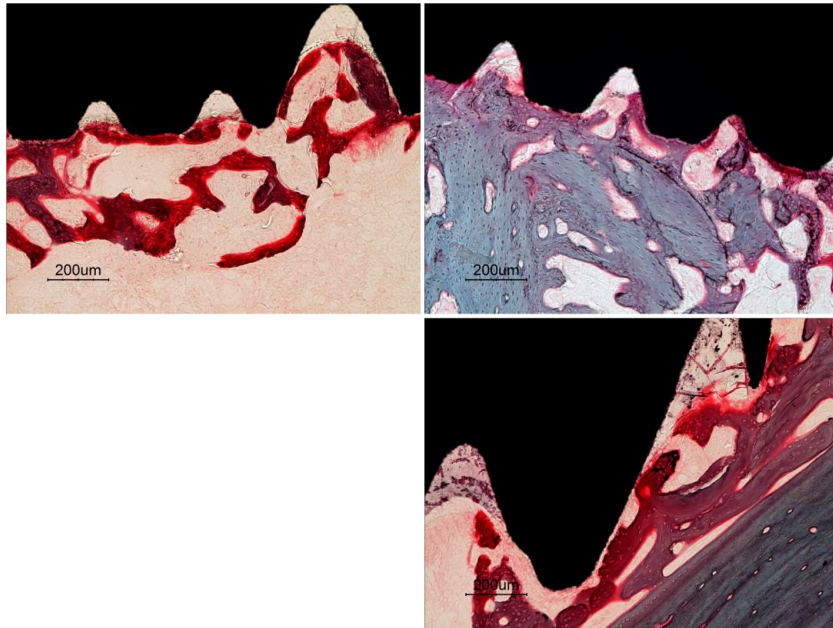


Figura 74. Osteointegración con el hueso trabecular para 5V5G; formación de escasas espículas con poca activación osteoblástica tras 1 semana de implantación (arriba izquierda); trabéculas tras 2 semanas de implantación (arriba derecha) en contacto con las zonas sin recubrir del implante; trabéculas formadas tras 8 semanas de implantación (abajo derecha) por activación del endostio de la cortical opuesta al lugar de inserción, donde se puede observar que en los puntos de contacto con el recubrimiento existe una fina banda fibrosa interpuesta entre el hueso y el implante.

Las espículas, inducidas por 5M5G dieron paso a trabéculas más finas que, junto con la escasa degradación del recubrimiento y la formación de tejido fibroso interpuesto entre el implante y el hueso, tampoco permitieron una completa osteointegración de las prótesis recubiertas con esta formulación al igual que en el caso de 5V5G (Figura 75).

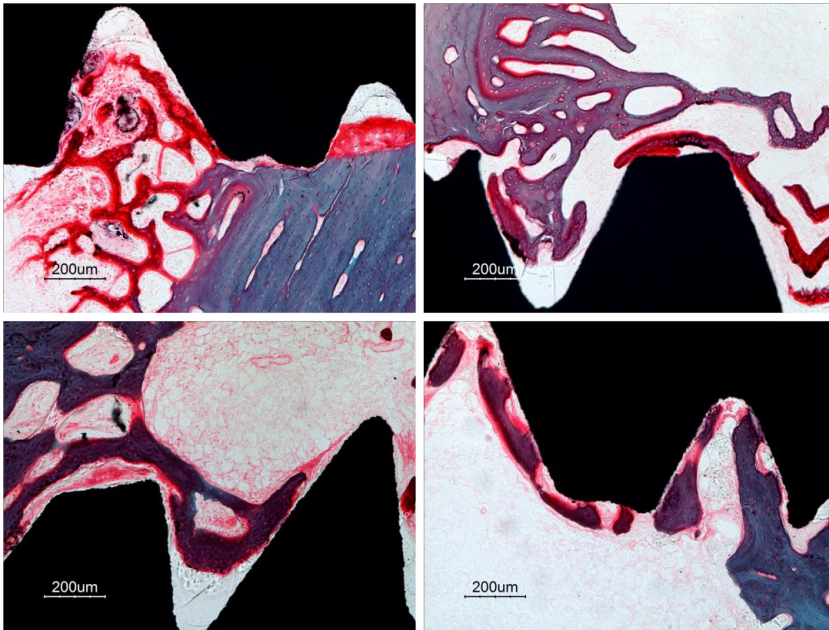


Figura 75. Osteointegración con el hueso trabecular para 5M5G; formación de espículas finas con activación osteoblástica tras 1 semana de implantación (arriba izquierda); trabéculas inmaduras y delgadas tras 2 semanas de implantación (arriba derecha); trabéculas maduras tras 4 semanas (abajo izquierda) y 8 semanas de implantación (abajo derecha) con una fina banda fibrosa interpuesta entre el hueso y el implante.

Activación osteoblástica

Para evaluar el grado de reactividad de las superficies se evaluó la activación osteoblástica del hueso alrededor del implante. A primeros tiempos fue cuando mayor activación osteoblástica se observó, siendo más abundante para 7M3T, luego para el Control (Figura 76) y menor para 5M5G.

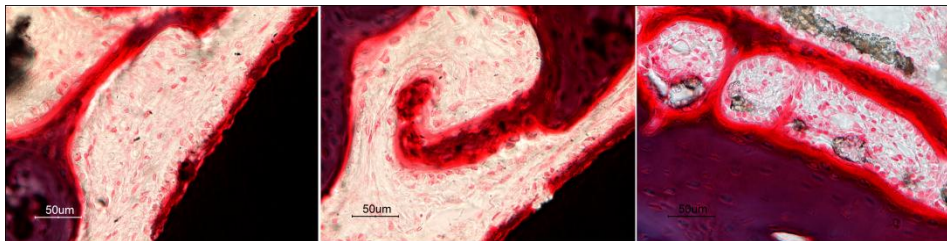


Figura 76. Detalle de la formación de espículas activas inducidas por el titanio (izquierda y centro) y el recubrimiento 7M3T (derecha) tras una semana de implantación. Se pueden observar los osteoblastos en los bordes del osteoide del nuevo hueso en formación.

En los cortes histológicos de 5V5G se observaron pocos osteoblastos adheridos a las espículas óseas. En el caso del material 5M5G, las espículas formadas a primeros

tiempos presentaron un menor grosor y menores ramificaciones que las espículas óseas inducidas por el titanio y 7M3T, dando un aspecto de espículas más rectas y menos sinuosas (“afiladas”, Figura 77).

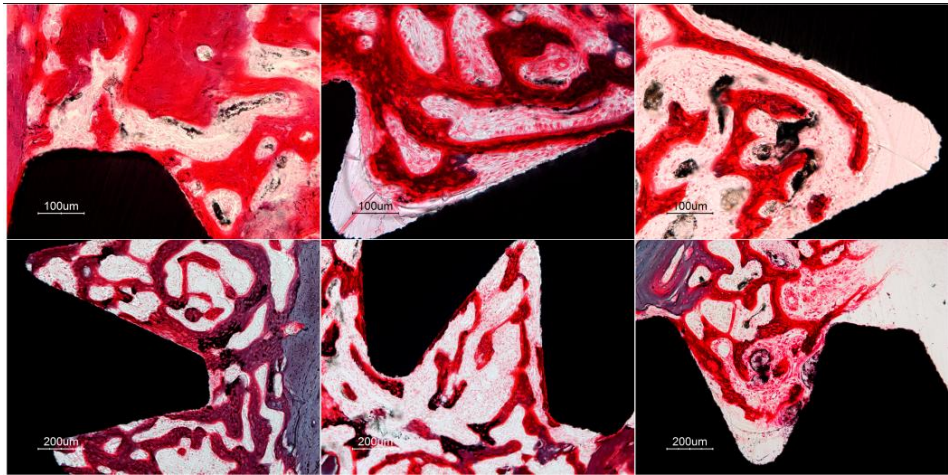


Figura 77. Espículas activas tras una semana de implantación para el Control (arriba izquierda), 7M3T (arriba centro) y 5M5G (arriba derecha). Estructura de las nuevas trabéculas formadas para el Control tras 4 semanas de implantación (abajo izquierda), para 7M3T tras 1 semana de implantación (abajo centro) y para 5M5G tras 1 semana de implantación (abajo derecha), donde se puede comparar la estructura “afilada” de 5M5G con la estructura trabecular típica inducida por el titanio y 7M3T.

Durante el estudio cualitativo de la osteointegración, se observó el fenómeno de la osteoconducción en las prótesis radiculares sin recubrir. El titanio ofreció una superficie apta para la adhesión celular, produciéndose la formación de nuevo hueso desde la superficie del implante, es decir mediante osteogénesis por contacto (Figura 78). La osteointegración de los recubrimientos tuvo lugar mediante formación de nuevo hueso sobre la superficie del antiguo hueso en la zona de peri-implantación (osteogénesis a distancia).

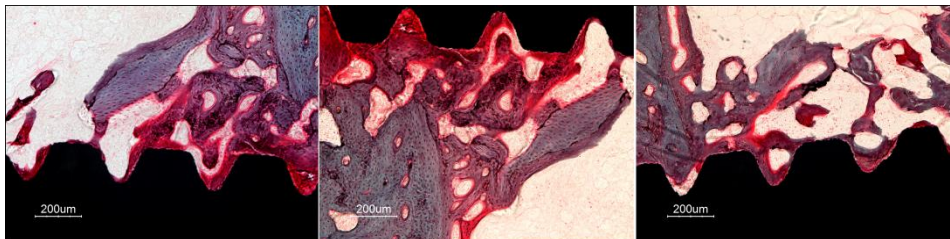


Figura 78. Imágenes del Control tras 2 semanas de implantación, donde se observa el fenómeno de osteoconducción del titanio con la formación de nuevo hueso mediante osteogénesis por contacto.

3.2.2.2. Histomorfometría Panorámica

Para el estudio cuantitativo de la osteointegración, primero se realizó el estudio de **Histomorfometría Panorámica**, para observar si existían diferencias entre el lugar de implantación de las prótesis implantadas. A partir de las imágenes panorámicas, como la de la Figura 79, obtenidas del *photomerge* de imágenes de microscopía óptica tomadas a pocos aumentos (2X), se realizaron distintas mediciones para evaluar la posición de cada implante en la porción proximal de la tibia, el alcance de la formación de nuevo hueso trabecular a lo largo del implante y el éxito del modelo experimental.



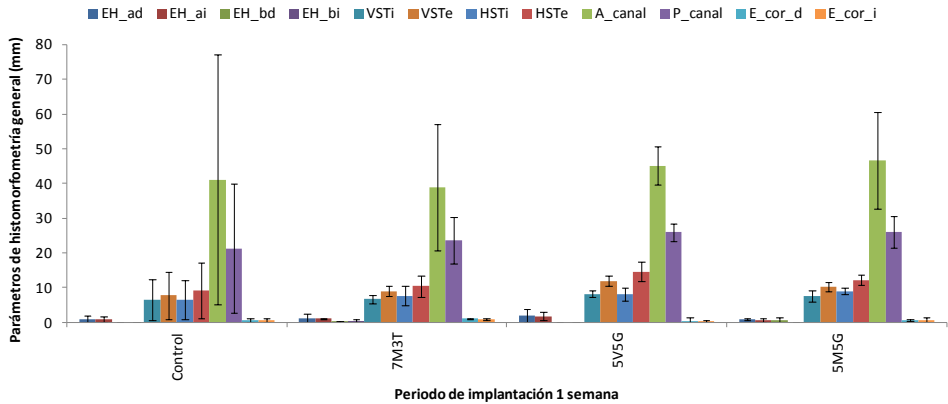
Figura 79. Imagen panorámica utilizada para las mediciones de la **Histomorfometría Panorámica**, resultado del *photomerge* de las imágenes de microscopía óptica tomadas a pocos aumentos (2X). Recubrimiento 5V5G tras 1 semana de implantación.

Las variables escogidas para este estudio fueron: la longitud (VSTi) y anchura internos de la tibia (HSTi), la longitud (VSTe) y anchura externos de la tibia (HSTe), el espesor de las corticales (derecha E_cor_d e izquierda E_cor_i), el área (A_canal) y perímetro (P_canal) del canal medular, el área del implante (A_impl), el alcance del hueso trabecular desde el endostio a lo largo del implante (derecha EH_ad e izquierda EH_ai) y el contacto del implante con la cortical opuesta (derecha EH_bd e izquierda EH_bi). La medición de cada parámetro y el estudio estadístico se realizaron tal y como se describió en el Capítulo 3.

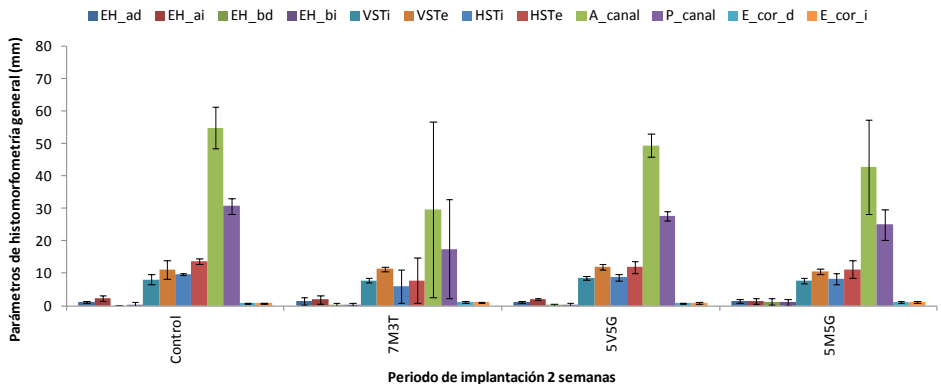
Las gráficas siguientes muestran valores de los parámetros de la **Histomorfometría Panorámica**, expresados en milímetros (mm), para las muestras

implantadas de la **Fase de Caracterización I** de implantación en tibia proximal de conejo tras 1 semana de implantación (Gráfica 12), 2 semanas de implantación (Gráfica 13), 4 semanas de implantación (Gráfica 14) y 8 semanas de implantación (Gráfica 15).

El estudio estadístico de estos parámetros histomorfométricos, a lo largo de los periodos de implantación, reveló que no había diferencias significativas entre los distintos materiales (prótesis con distintos recubrimientos y sin recubrir) ni entre los periodos de estudio para cada material.

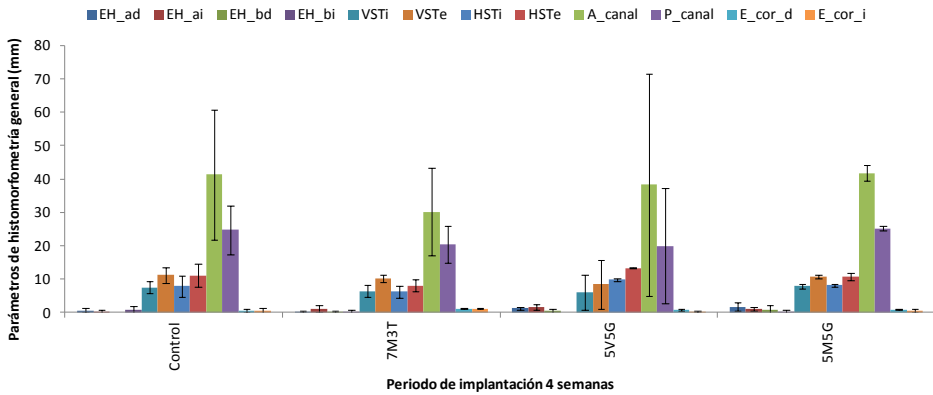


Gráfica 12. Valores de los parámetros de la **Histomorfometría Panorámica** (mm) para las muestras implantadas de la **Fase de Caracterización I** tras 1 semana de implantación en tibia proximal de conejo para las variables; alcance del hueso trabecular desde el endostio a lo largo del implante (derecha EH_ad e izquierda EH_ai); contacto del implante con la cortical opuesta (derecha EH_bd e izquierda EH_bi); longitud de la tibia (interna VSTi y externa VSTe); anchura de la tibia (interna HSTi y externa HSTe); área del canal medular (A_canal), perímetro del canal medular (P_canal); y espesor de las corticales (derecha E_cor_d e izquierda E_cor_i).

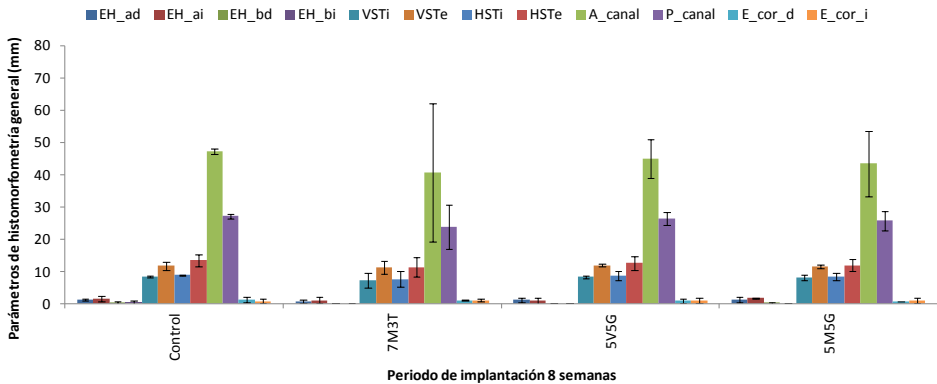


Gráfica 13. Valores de los parámetros de la **Histomorfometría Panorámica** (mm) para las muestras implantadas de la **Fase de Caracterización I** tras 2 semanas de implantación en tibia proximal de conejo para las variables; alcance del hueso trabecular desde el endostio a lo largo del implante (derecha EH_ad e izquierda EH_ai); contacto del implante con la cortical opuesta (derecha EH_bd e izquierda EH_bi); longitud de la tibia (interna VSTi y externa VSTe); anchura de

la tibia (interna HSTi y externa HSTe); área del canal medular (A_canal), perímetro del canal medular (P_canal); y espesor de las corticales (derecha E_cor_d e izquierda E_cor_i).



Gráfica 14. Valores de los parámetros de la *Histomorfometría Panorámica* (mm) para las muestras implantadas de la *Fase de Caracterización I* tras 4 semanas de implantación en tibia proximal de conejo para las variables; alcance del hueso trabecular desde el endostio a lo largo del implante (derecha EH_ad e izquierda EH_ai); contacto del implante con la cortical opuesta (derecha EH_bd e izquierda EH_bi); longitud de la tibia (interna VSTi y externa VSTe); anchura de la tibia (interna HSTi y externa HSTe); área del canal medular (A_canal), perímetro del canal medular (P_canal); y espesor de las corticales (derecha E_cor_d e izquierda E_cor_i).



Gráfica 15. Valores de los parámetros de la *Histomorfometría Panorámica* (mm) para las muestras implantadas de la *Fase de Caracterización I* tras 8 semanas de implantación en tibia proximal de conejo para las variables; alcance del hueso trabecular desde el endostio a lo largo del implante (derecha EH_ad e izquierda EH_ai); contacto del implante con la cortical opuesta (derecha EH_bd e izquierda EH_bi); longitud de la tibia (interna VSTi y externa VSTe); anchura de la tibia (interna HSTi y externa HSTe); área del canal medular (A_canal), perímetro del canal medular (P_canal); y espesor de las corticales (derecha E_cor_d e izquierda E_cor_i).

Estos resultados indicaron que, pese a estar implantados a distinta altura a lo largo de la tibia proximal, no existieron diferencias histomorfométricas entre estas zonas de la tibia. Indicándose, además, que ni si quiera existen diferencias entre el alcance de la formación de nuevo hueso trabecular inducida por los distintos

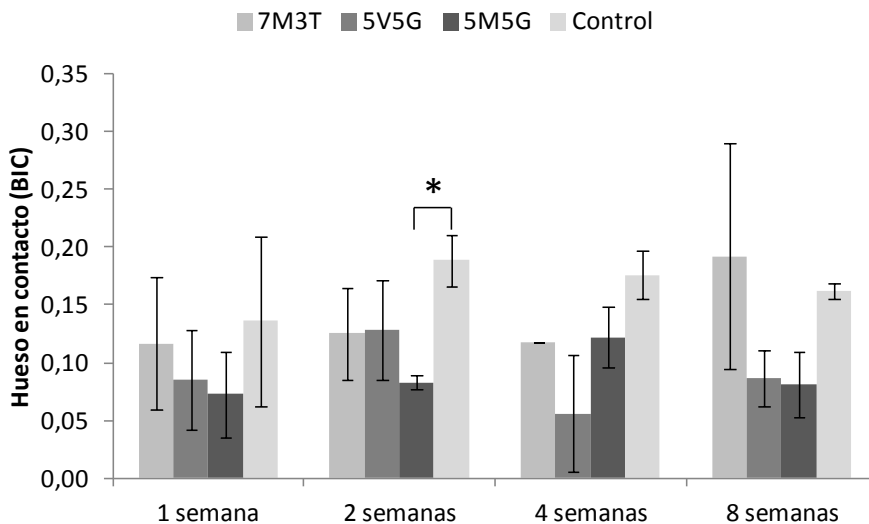
materiales. Seguramente estos resultados se deban a la gran dispersión observada en las medidas.

3.2.2.3. Histomorfometría Detallada

Tras la **Histomorfometría Panorámica** se pasó a evaluar los datos recogidos de las variables histomorfométricas de *Hueso en contacto con el implante*, *Hueso entre roscas* y *Hueso peri-implante* de la **Histomorfometría Detallada** para la **Fase de Caracterización I**.

En la Gráfica 16 se muestran los valores para la variable *Hueso en contacto con el implante* para los recubrimientos 7M3T, 5V5G y 5M5G y el Control obtenidos tras el estudio histomorfométrico de las imágenes de microscopía óptica de los cortes histológicos de las muestras tras el cumplimiento de los periodos de estudio de 1, 2, 4 y 8 semanas.

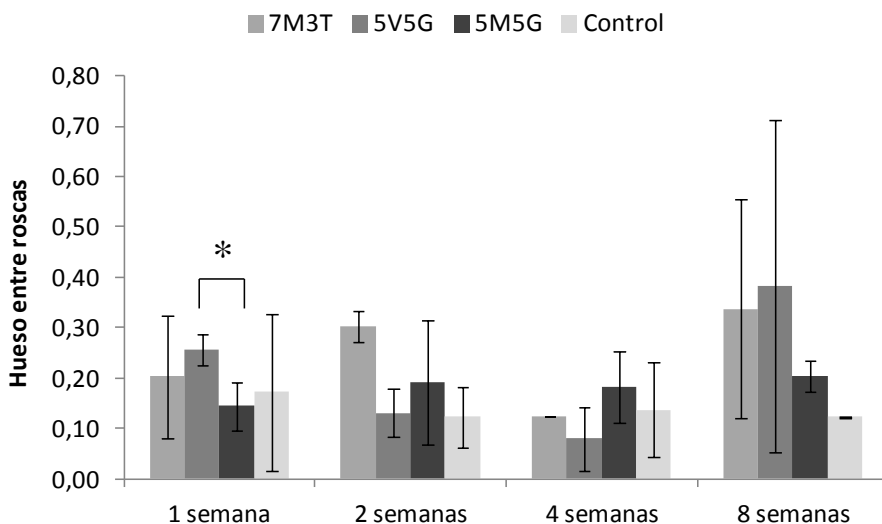
Se observaron los mayores valores para el Control tras 1, 2 y 4 semanas de implantación, siendo sólo superado por 7M3T a 8 semanas. Tan sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el recubrimiento 5M5G y el Control tras 2 semanas de implantación ($p=0,046$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos periodos para cada material.



Gráfica 16. Valores para el Hueso en contacto con el implante para los recubrimientos 7M3T, 5V5G y 5M5G y el Control obtenidos tras el estudio histomorfométrico de las imágenes de microscopía óptica de los cortes histológicos de las muestras tras el cumplimiento de los periodos de estudio de 1, 2, 4 y 8 semanas.

En la Gráfica 17 se muestran los valores para la segunda variable, *Hueso entre roscas*, para los recubrimientos 7M3T, 5V5G y 5M5G y el Control obtenidos tras el estudio histomorfométrico de las imágenes de microscopía óptica de las muestras tras el cumplimiento de los periodos de estudio de 1, 2, 4 y 8 semanas.

Para esta segunda variable, se observaron los mayores valores de éste parámetro para todos los recubrimientos y, en especial, para el 7M3T y 5V5G para 1, 2 y 8 semanas en comparación con el titanio. Sin embargo, y dada a la dispersión de datos, tan sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre 5V5G y 5M5G para 1 semana ($p = 0,046$), al ser éste último el menor de todos los datos recogidos para este periodo. Con el material 7M3T y el Control se observó una gran variabilidad ($p = 0,05$), así como entre 7M3T y 5V5G ($p = 0,05$). Cabe señalar que las mayores diferencias tuvieron lugar tras 8 semanas de implantación, donde se observó que la cantidad de hueso en contacto con el implante aumentó para todos los materiales excepto para el Control que mantuvo prácticamente los mismos valores desde la primera semana de implantación. Los valores mayores para 8 semanas fueron registrados para 7M3T y 5V5G, ambos con dispersiones elevadas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos periodos para cada material.

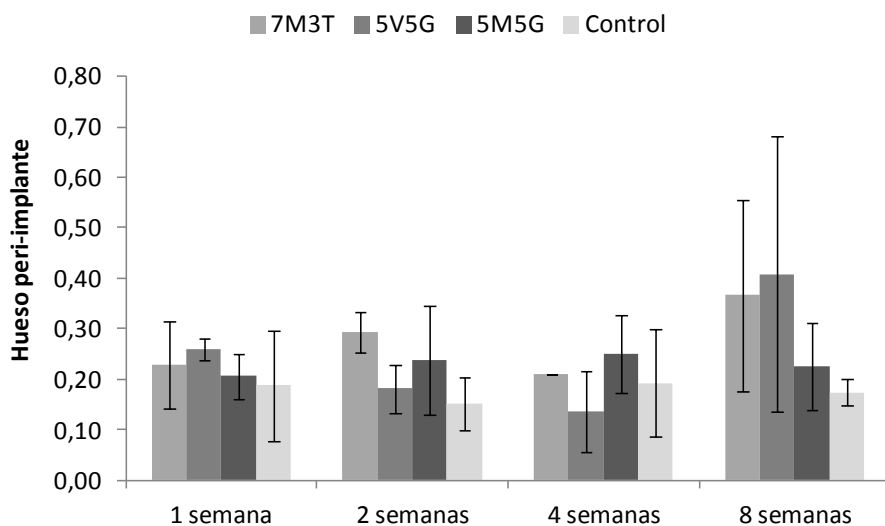


Gráfica 17. Valores para el Hueso entre roscas para los recubrimientos 7M3T, 5V5G y 5M5G y el Control obtenidos tras el estudio histomorfométrico de las imágenes de microscopía óptica de las muestras tras el cumplimiento de los periodos de estudio de 1, 2, 4 y 8 semanas.

En el caso de la variable de *Hueso peri-implante*, los valores para los recubrimientos 7M3T, 5V5G y 5M5G y el Control, obtenidos tras el estudio

histomorfométrico de los cortes histológicos tras los periodos de estudio de 1, 2, 4 y 8 semanas, se muestran en la Gráfica 18.

Para la tercera variable histomorfométrica, los recubrimientos mostraron a 1, 2 y 4 semanas valores algo mayores que el Control, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Las mayores diferencias fueron observadas en el caso de los recubrimientos 7M3T y 5V5G, que aumentaron tras 8 semanas de implantación en comparación al 5M5G y Control, aunque sin presentar diferencias significativas debido, de nuevo, a la gran dispersión de los datos ($p = 0,05$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos periodos para cada material.



Gráfica 18. Hueso peri-implante para los recubrimientos 7M3T, 5V5G y 5M5G y el Control obtenidos tras el estudio histomorfométrico de los cortes histológicos de las muestras tras el cumplimiento de los periodos de estudio de 1, 2, 4 y 8 semanas.

Los implantes con el recubrimiento 7M3T fueron los únicos que, debido a la rápida degradación de su formulación, ofrecieron a 8 semanas una superficie lo bastante estable para que se produjera el contacto hueso-implante observado en los implantes Control. Debido a la degradación continua de los recubrimientos, la superficie inestable no fue favorable para la osteogénesis por contacto con la superficie, estimulándose la osteogénesis a distancia y, con ella, un aumento del hueso alrededor del implante (*variables Hueso entre roscas y Hueso peri-implante*).

3.2.3. Degradación sol-gel *in vivo*

Con el objetivo de determinar la degradación *in vivo* de los recubrimientos, se realizó un estudio de los recubrimientos implantados durante los periodos de estudio correspondientes a la **Fase de Caracterización I** mediante imágenes de microscopía óptica y electrónica de barrido.

Cabe recordar que, en la **Fase de Caracterización I**, parte de las muestras implantadas fueron procesadas para su observación a microscopio óptico y parte se procesaron para su estudio mediante microscopía electrónica de barrido (Capítulo 3).

Mientras que en la zona de contacto con el hueso cortical la degradación fue baja (Figura 80, imágenes a.1 y b.1), pudimos observar cómo en los valles del cuerpo del implante que estaban ocupados por trabéculas óseas el recubrimiento comenzaba a perder espesor después de dos semanas de implantación (Figura 80, imágenes a.2 y a.3).

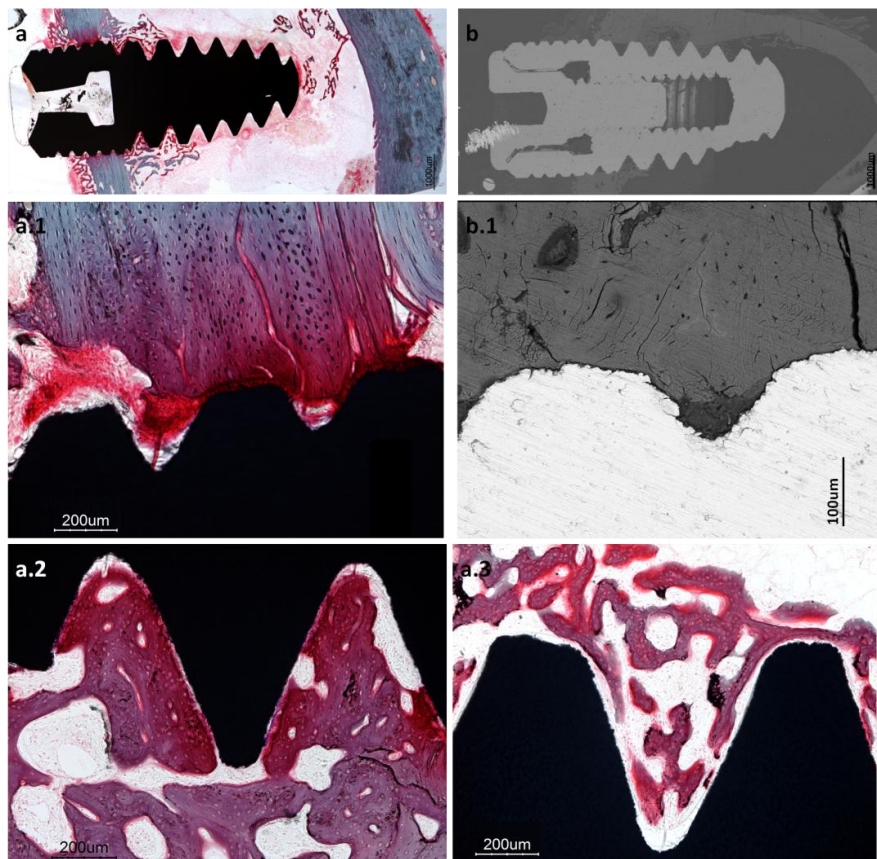


Figura 80. Imágenes de microscopía óptica (serie a) y SEM (serie b) para el recubrimiento 7M3T tras 2 semanas de implantación; imagen panorámica del implante (a y b), recubrimiento

en contacto con el hueso cortical (a.1 y b.1) y recubrimiento comenzando a degradar en contacto con el hueso trabecular (a.2 y a.3).

Esta degradación fue más acusada con el tiempo hasta el punto de hacer desaparecer por completo el recubrimiento tras ocho semanas (Figura 81, imágenes a.1, b.1 y b.2). Sin embargo, en las zonas donde el recubrimiento se encontraba en contacto con el espacio medular, el recubrimiento permaneció intacto en el tiempo (Figura 81, imagen a.2).

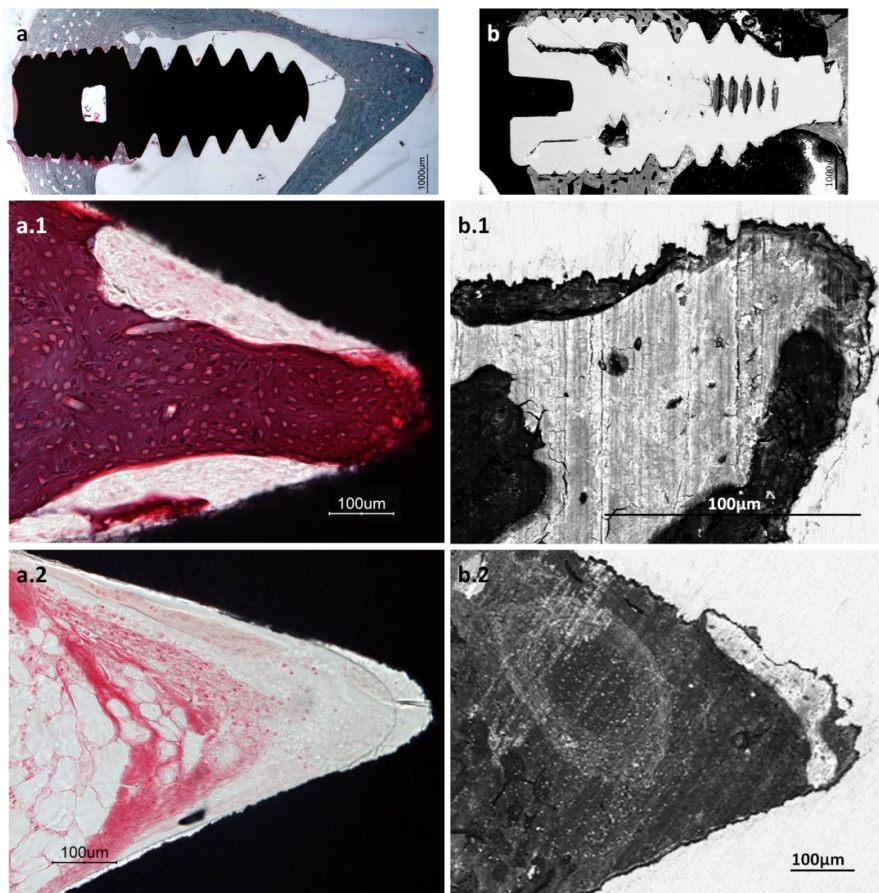


Figura 81. Imágenes de microscopía óptica (serie a) y SEM (serie b) para el recubrimiento 7M3T tras 8 semanas de implantación; imagen panorámica del implante (a y b), degradación completa del recubrimiento en valles ocupados por trabéculas óseas (a.1, b.1 y b.2); recubrimiento en contacto con el espacio medular (a.2) que no degrada.

En el caso del recubrimiento 5V5G, éste no degradó en contacto con el hueso trabecular, mostrándose tras ocho semanas de implantación tal cual fue implantado (Figura 82, imágenes a.1 y b.1). Como en el caso anterior, tampoco degradó ni en contacto con el hueso cortical ni con el espacio medular (Figura 82, imágenes a.2 y b.2). La presencia de la cápsula fibrosa interpuesta entre el recubrimiento y el hueso

podiera ser la explicación a la falta de degradación del recubrimiento no evidenciada en el ensayo de degradación *in vitro*. Aunque en las zonas donde esta cápsula no es perceptible, tampoco ocurre la degradación del recubrimiento (Figura 82, imágenes a.3 y b.3).

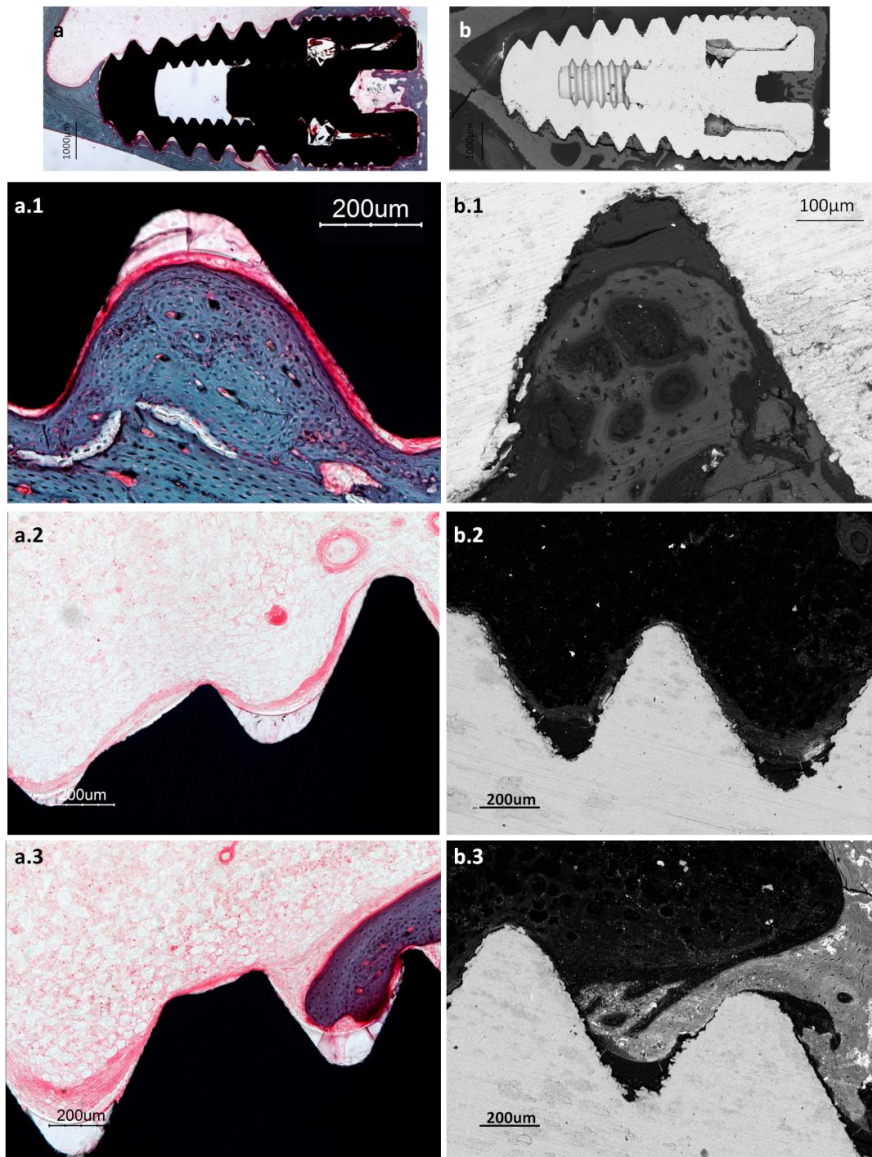


Figura 82. Imágenes de microscopía óptica (serie a) y SEM (serie b) para el recubrimiento 5V5G tras 8 semanas de implantación; imagen panorámica del implante (a y b), recubrimiento en contacto con el hueso trabecular con cápsula fibrosa interpuesta (a.1 y b.2) que no degrada; recubrimiento en contacto con el espacio medular (a.2 y b.2) que no degrada; recubrimiento en contacto con el hueso trabecular sin cápsula fibrosa interpuesta (a.3 y b.3) que tampoco degrada.

En las imágenes de SEM para el recubrimiento 5V5G, se observaron, tras una semana de implantación, algunas zonas intermedias entre el recubrimiento y la resina de inclusión o el hueso con un tono de gris diferente a todos estos materiales (Figura 83 y Figura 84).

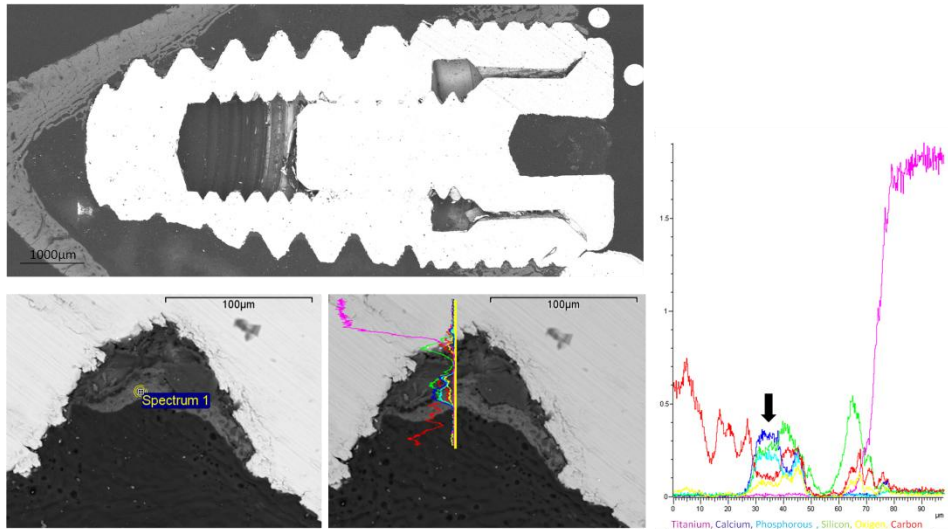


Figura 83. Imágenes de SEM de un implante recubierto con la formulación 5V5G (arriba) tras una semana de implantación en el que se encontró una zona intermedia (abajo izquierda), marcada como *Spectrum 1*, sobre la cual se realizó un microanálisis en perfil de línea (abajo derecha) que mostró que existía una superposición de señales para calcio, fósforo y silicio (flecha negra en gráfica derecha).

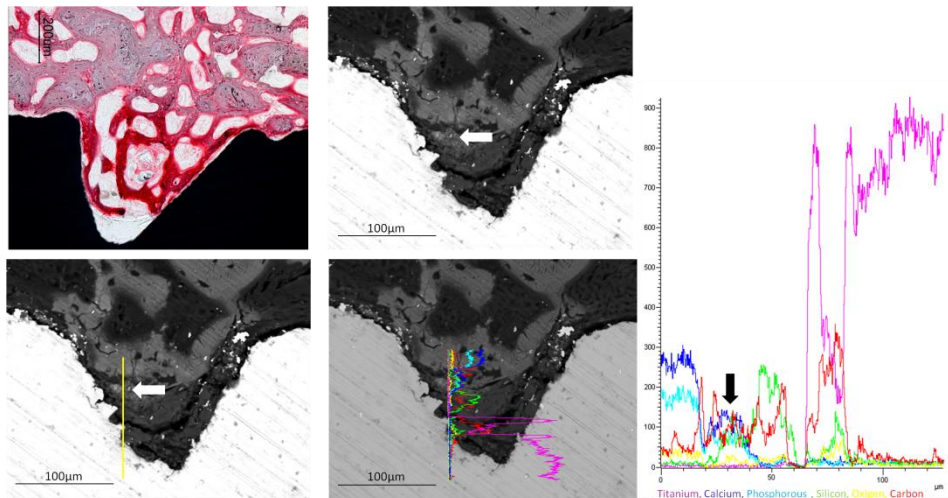


Figura 84. Imagen de SEM de un implante recubierto con la formulación 5V5G (arriba derecha) tras una semana de implantación correspondiente a la imagen de microscopía óptica (arriba izquierda), donde se encontró una zona intermedia marcada con una flecha blanca, sobre la cual se realizó un microanálisis en perfil de línea (abajo derecha e izquierda), que mostró que

en esa zona existía una superposición de señales para calcio, fósforo y silicio (flecha negra en gráfica derecha).

Mediante microanálisis puntual y/o en perfil de línea se determinó una zona intermedia en la que se superponían las señales para el calcio, el fósforo y el silicio, pudiendo ser interpretada como una zona de inducción a la formación de nuevo hueso debido a la liberación de silicio (Figura 83 y Figura 84, gráficas de la derecha). Por lo que entonces se deduciría que, aunque imperceptible mediante la evaluación realizada, sí existió un mínimo de degradación del recubrimiento, al menos antes de que se cumpliera el periodo de una semana tras la implantación.

Lo observado en el caso del recubrimiento 5M5G, tanto con las imágenes de microscopía óptica como con las de microscopía electrónica de barrido, indicó que tampoco degradaba, del mismo modo que el 5V5G, pudiéndolo encontrar en el mismo estado tras 8 semanas de implantación tanto en las zonas en contacto con el hueso cortical, con el espacio medular o el hueso trabecular, como en presencia o ausencia de cápsula fibrosa interpuesta (Figura 85).

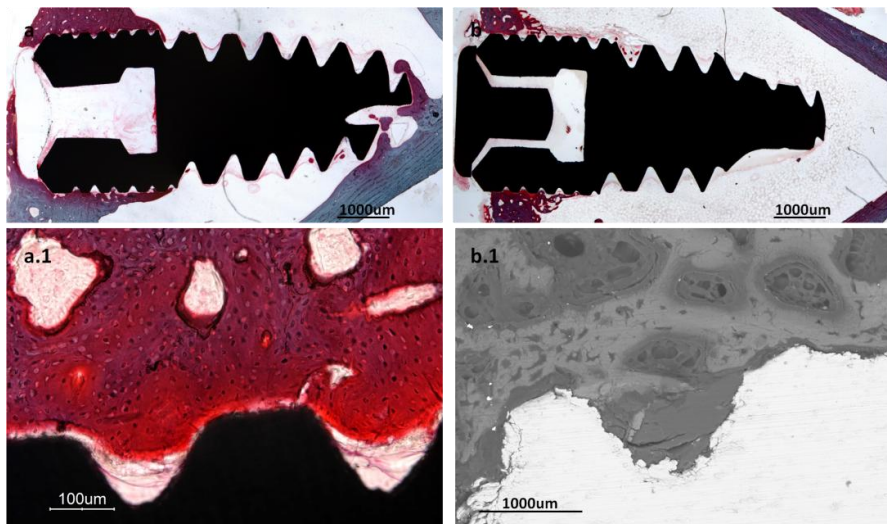


Figura 85. Imágenes del implantes recubiertos con la formulación 5M5G tras 8 semanas (imágenes de microscopía óptica, serie a) y 2 semanas de implantación (imágenes de SEM, serie b) para el recubrimiento; imágenes panorámicas de los implantes (a y b), imágenes del recubrimiento en contacto con el hueso cortical (a.1 y b.2).

En este caso, también fueron localizadas, tras una semana, zonas intermedias entre el hueso y el recubrimiento que mostraban un tono de gris diferente al del hueso, la resina de inclusión y el recubrimiento (Figura 86). Como en el caso del recubrimiento 5V5G se realizó un microanálisis, bien puntual y/o de perfil en línea, en el que se observó para esas zonas (Figura 86, imágenes a.1 y b.1) una superposición de

las señales para calcio, fósforo y silicio (Figura 86, imágenes a.2, a.3, b.2 y b.3). De nuevo, interpretamos esta zona como una zona de inducción a la formación de nuevo hueso debida a la liberación de silicio. Deduciendo también que, aunque imperceptible mediante la evaluación realizada, también existió un mínimo de degradación del recubrimiento 5M5G, al menos antes de que se cumpliera el periodo de una semana tras la implantación.

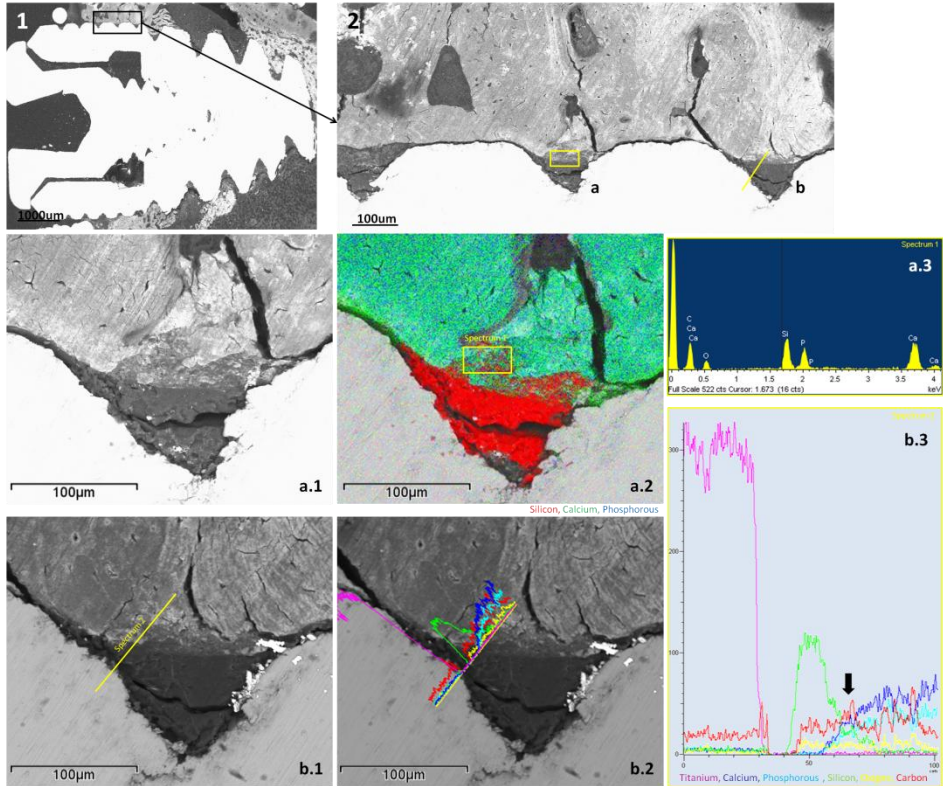


Figura 86. Imagen de SEM de un implante recubierto con la formulación 5M5G (1) tras una semana de implantación y el detalle de su zona superior en contacto con el hueso cortical (2) donde se observan dos zonas (a y b) que presentan la interfaz. Para la primera zona (a.1) se realizó microanálisis con un mapeado general (a.2) donde se solaparon las señales para calcio (azul), fósforo (amarillo) y silicio (rojo) y un espectro de la zona que recogía la zona ocupada por el rectángulo amarillo, titulado *Spectrum 1*, en a.2, en el cual (a.3) se detectaron los tres elementos, calcio (Ca), fósforo (P) y silicio (Si). Para la segunda zona (b.1) el microanálisis se realizó en forma de perfil en línea atravesando la zona de estudio (b.2), que también mostró superposición de señales para calcio, fósforo y silicio (flecha negra en gráfica derecha, b.3).

El recubrimiento 7M3T consiguió degradar completamente tras 8 semanas de implantación en las zonas en contacto o proximidad con hueso trabecular de nueva formación. Sin embargo, ni el recubrimiento 5V5G ni el recubrimiento 5M5G, cuya tasa de degradación *in vitro* fue más lenta, consiguieron degradar durante la implantación *in vivo*, permaneciendo intactos tras 8 semanas de implantación. El aislamiento debido

a la cápsula fibrosa formada entre el recubrimiento y el hueso, en estos recubrimientos, pudiera ser el motivo de la ausencia de degradación. No obstante, precisamente en las zonas de hueso/médula-recubrimiento para 5V5G y 5M5G, se observó una banda con interposición de señales de fósforo, calcio y silicio indicativo de la reactividad de las superficies de estos recubrimientos para la formación de nuevo hueso.

4. Discusión

Para todas las formulaciones se obtuvo un sol transparente y sin precipitados, con una viscosidad adecuada para obtener una aplicación correcta sobre el material (Figura 47). Los espesores registrados fueron mayores para los recubrimientos 5V5G y 5M5G que para 7M3T (Figura 48 - Figura 51), teniendo, además, 5M5G mayor efecto sobre la topografía del titanio que 7M3T al reducir su rugosidad a casi la mitad (Tabla 16, Figura 52). Todos los recubrimientos mostraron una buena adherencia al sustrato, evaluada *ex vivo* en cóndilo femoral de cerdo (Figura 53).

Salzman [238] realizó un estudio correlacionando los valores de adhesión de diferentes tipos celulares a distintas superficies poliméricas con su ángulo de contacto. En este estudio se observa que los mayores valores de adhesión celular se obtuvieron en superficies que mostraron un ángulo de contacto dentro del rango de 70°–80°, siendo el máximo encontrado para la adhesión entorno a 70°. Todos los recubrimientos mostraron valores de ángulo de contacto en el entorno de este valor, mientras que el Control presentó un valor de ángulo de contacto superior a 80° (Tabla 18). Los datos de adhesión encontrados mostraron una mayor adhesión para 5M5G y el Control (Gráfica 8). En cuanto a la morfología celular inducida por los recubrimientos, se observó que los recubrimientos indujeron osteoblastos alargados con escasos filopodios, observándose osteoblastos más extendidos y con mayores anclajes para el Control (Figura 54). También se observó una mayor y más temprana actividad de ALP inducida por 5M5G (Gráfica 10), mostrando valores de proliferación similares al resto de materiales para 7 días (Gráfica 9), pero menores que 7M3T y el Control para 2 semanas.

No obstante, el comportamiento *in vitro*, observado tanto para osteoblastos como para mesenquimales de tejido adiposo sobre los recubrimientos, no guardó relación con los efectos inducidos sobre los tejidos vivos. Como se comentó en la Introducción, la caracterización *in vitro* no es capaz de demostrar la respuesta de los tejidos a los materiales, siendo esenciales los modelos animales para evaluar la

respuesta de los tejidos de un biomaterial [174]. En la observación al microscopio óptico de los cortes histológicos el recubrimiento 7M3T mostró cualitativamente un mejor comportamiento con los tejidos adyacentes que los demás recubrimientos, no encontrándose tejido fibroso interpuesto entre éste y el hueso trabecular, e incluso que el Control (Figura 73). En este estudio, el recubrimiento 7M3T mostró a primeros tiempos un mejor estado de la médula ósea (Figura 56 y Figura 57) y una mayor activación osteoblástica que el Control (Figura 76), con una buena evolución en el tiempo de la cápsula fibrosa (Figura 61) y la formación de trabéculas óseas bien formadas que acabaron por osteointegrar al implante al finalizar el estudio. Sin embargo, los recubrimientos 5V5G y 5M5G indujeron la no recuperación de la médula ósea con el tiempo, acompañándola de una mayor cápsula fibrosa que rodeó al implante, interponiéndose entre el hueso y el recubrimiento (Figura 74 y Figura 75).

En las imágenes histológicas se observó cómo el hueso en contacto en las prótesis recubiertas tuvo lugar, en muchos casos, en zonas donde el espesor del recubrimiento no era visible a 20X con el microscopio óptico, esto puede deberse a que la adhesión sobre la superficie recubierta se viera menos inducida debido al carácter biodegradable de los recubrimientos. Las superficies que degradan rápidamente presentan una superficie inestable para el crecimiento celular y la formación tisular, mostrando éstos un crecimiento óseo por osteogénesis a distancia en lugar de una osteogénesis de contacto (Figura 73) [2]. Sobre estas superficies, las proteínas (fibronectina, laminina, vitronectina,...) y citoquinas (BSP y OPN) adheridas, que favorecen la adhesión celular mediada por integrinas y la nucleación de cristales de apatita para la formación de la línea cementada, se desprenden de la superficie debido a que la degradación del recubrimiento no ofrece una superficie lo suficientemente estable. Con el tiempo, la degradación total del recubrimiento permite que las proteínas y citoquinas se adhieran de forma estable, favoreciendo la formación de nuevo hueso sobre su superficie (Figura 87). Al mismo tiempo, la degradación de los recubrimientos libera silicio, que es osteoinductor. Por ello, en el caso de las prótesis recubiertas prevaleció la osteogénesis a distancia para la formación de nuevo hueso. Al verse más favorecida la osteogénesis a distancia, debido a la liberación de silicio durante la degradación de la superficie del recubrimiento, los recubrimientos mostraron mayor cantidad de nuevo hueso alrededor del implante, *Hueso entre roscas* (Gráfica 17) y *Hueso peri-implante* (Gráfica 18), que de *Hueso en contacto* con el implante (Gráfica 16).

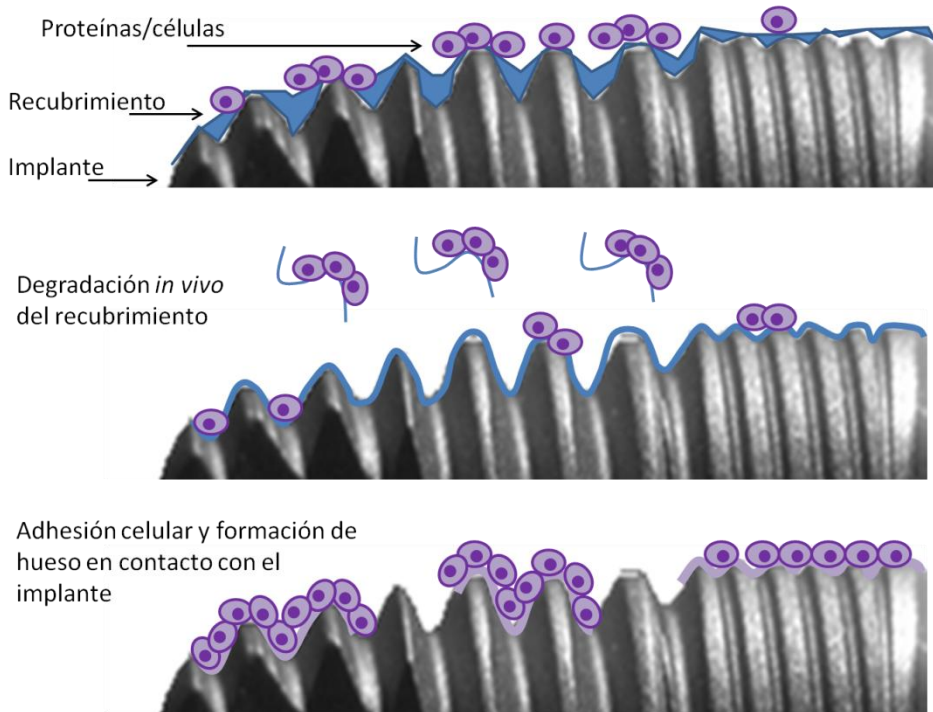
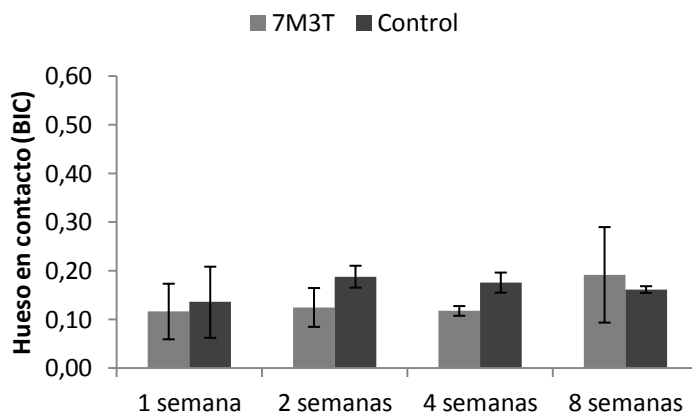


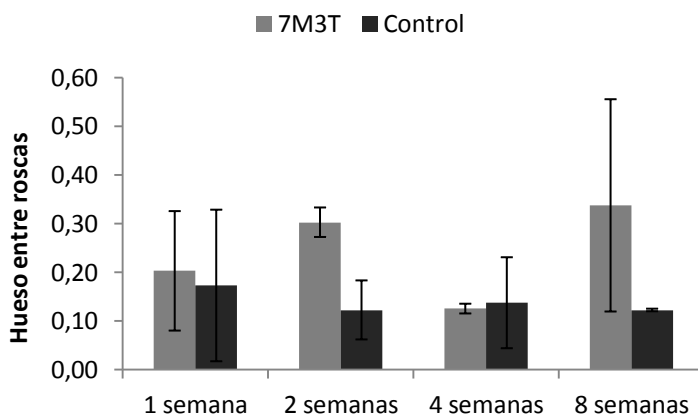
Figura 87. Esquema de la relación entre la degradación de los recubrimientos y la adhesión de proteínas y células que promueven la formación ósea; las proteínas y citoquinas se desprenden de la superficie debido a que la degradación del recubrimiento no ofrece una superficie lo suficientemente estable (centro); la degradación total del recubrimiento deja libre la superficie del implante de titanio que permite que las proteínas y citoquinas se adhieran y favorezcan la formación de nuevo hueso sobre su superficie (línea cementada con osteoblastos adheridos, abajo).

El recubrimiento 7M3T fue el único que consiguió degradar completamente tras 8 semanas de implantación. Su completa degradación aumentó la superficie de titanio libre con la que el nuevo hueso formado por osteogénesis a distancia pudo entrar en contacto con el implante, aumentando el valor de la variable *Hueso en contacto* con el implante ($0,192 \pm 0,093$) para el recubrimiento 7M3T (Gráfica 16). En las siguientes gráficas podemos comparar las tendencias de los distintos parámetros histomorfométricos para el recubrimiento 7M3T y el Control. Así pues, para la variable *Hueso en contacto* con el implante (Gráfica 19), mientras el recubrimiento parece inducir el contacto directo implante-hueso tras la degradación total del recubrimiento a 8 semanas, la inducción del Control no varía puesto que la superficie estable del titanio siempre está disponible a lo largo de todo el ensayo.

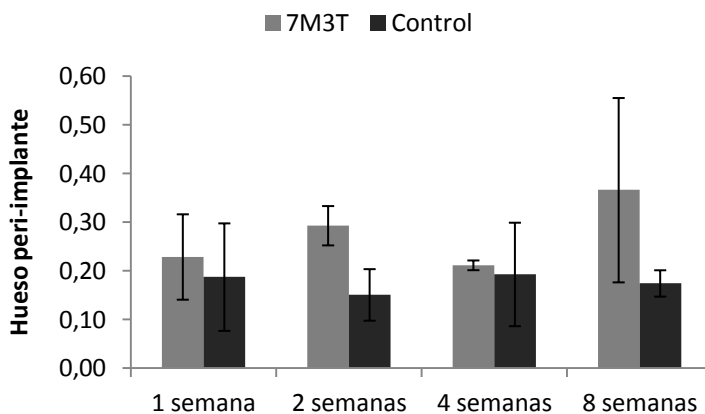


Gráfica 19. Valores de *Hueso en contacto* para el recubrimiento 7M3T y el Control.

Para las variables *Hueso entre roscas* (Gráfica 20) y *Hueso peri-implante* (Gráfica 20), las tendencias observadas fueron similares. Mientras que la capacidad de osteointegración del Control no varía con el tiempo, el recubrimiento parece que es capaz de inducir la osteogénesis a distancia y rodearse de nuevo hueso a lo largo de las semanas de implantación.



Gráfica 20. Valores de *Hueso entre roscas* para el recubrimiento 7M3T y el Control.



Gráfica 21. Valores de *Hueso peri-implante* para el recubrimiento 7M3T y el Control.

Debido a que el modelo de implantación, aunque ampliamente descrito en bibliografía para osteointegración de implantes dentales [172, 192, 196, 197, 198, 199, 200], presentó una insuficiente estabilidad primaria, el proceso de osteointegración dependió en gran medida del carácter osteoinductor de los materiales. Así pues, la rápida degradación de 7M3T favoreció la estabilización de la superficie con el tiempo y la liberación de compuestos de silicio, por lo que tras la completa degradación del recubrimiento (tras 8 semanas) el nuevo hueso inducido (por el efecto del silicio liberado), por osteogénesis a distancia, pudo contactar directamente con la superficie del implante. En el caso del Control, se indujo la osteogénesis por contacto iniciándose desde el principio un contacto directo con el hueso y una integración del implante por osteoconducción, puesto que la superficie del titanio, estable y libre, estaba disponible desde el inicio del ensayo.

El silicio (en concentración menor de 2 mM), a un pH entre 7 y 9, se encuentra en forma soluble como ácido ortosilícico [107]. El pH de la matriz extracelular de la médula ósea es de alrededor de 7,4 [239, 240, 241, 242], por lo que cabría esperar que la especie más abundante de compuestos de silicio en la matriz extracelular fuera el ácido ortosilícico. Está recogido en la bibliografía que el ácido ortosilícico promueve la proliferación osteoblástica, la diferenciación de la matriz extracelular, la actividad enzimática (por ejemplo de ALP) y la expresión génica [107], así como también promueve el crecimiento de hBMSC [102]. Además, los trabajos de Gao [104], Maheira [105] Wiens [99] y Han [105] determinan que el silicio, proveniente de la degradación de biomateriales ricos en sílice, desencadena selectivamente patrones de expresión de genes de osteoblastos (incluyendo la OCN, ALP Col $\alpha 1$ y Col $\alpha 2$ y OPN), induciendo la proliferación y diferenciación de osteoblastos, la formación de nódulos

de mineralización y la inhibición de la osteoclastogénesis. Así pues, deducimos que la liberación *in vivo* de compuestos de silicio de los recubrimientos sol-gel evaluados indujo activación osteoblástica, alcanzándose un aumento en el *Hueso en contacto* con el implante tras ocho semanas de implantación.

En muestras de 1 y 2 semanas de los recubrimientos 5V5G y 5M5G se observó, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), una zona intermedia hipermineralizada [2] con estructura amorfa electrodensa en la interfaz hueso-implante [243] y hueso-espacio medular (Figura 83, Figura 84, Figura 86). Neo y colaboradores (en la revisión de [243]) desarrollan dos teorías para explicar la zona amorfa entre el hueso y los materiales bioactivos: (1) precipitación espontánea de una capa de fosfato cálcico cristalino de una solución sobre la superficie del implante y (2) formación de una matriz calcificada, biológica y afibrilar análoga a las líneas cementadas encontradas en los límites del hueso natural en lugares de remodelado óseo. Davies, en su revisión de 1996 [243], comenta que este tipo de matriz ha sido observada en imágenes de SEM tanto de cultivos osteogénicos como también en la zona de unión hueso-implante *in vivo* [243].

Durante el proceso natural de remodelado óseo, sobre la superficie de resorción del antiguo hueso, se depositan proteínas no colágenas (OPN y BSP) sintetizadas por los osteoblastos en diferenciación que inducen la nucleación de HCA [243, 104], formándose la línea cementada. Ésta forma la primera matriz no colágena sobre la cual se anclarán las fibras de colágeno de la matriz colágena calcificada secretada por los osteoblastos adheridos [2]. Davies comenta que muchos autores han observado que el patrón de tinción de la zona de contacto hueso-implante bioactivo es similar al encontrado en líneas cementadas en el hueso [243].

En la evaluación de la degradación *in vivo* de los recubrimientos sol-gel realizada en esta Tesis, encontramos zonas hipermineralizadas entre el recubrimiento y la médula ósea (Figura 83). Esta zona no pudiera ser la correspondiente a la línea cementada porque no hay hueso cerca, ya que, según Davies [2], ésta se forma en la osteogénesis por contacto. Además, esta línea dice que tiene un espesor de 0,9 – 1,5 μm [2], aunque Ravaglioli aumenta el rango hasta 2 μm [244]. Por tanto, la explicación a su formación puede ser la formación de una capa de HCA formada por la bioactividad de la superficie del recubrimiento, sobre la cual Davies opina que, en esencia, es lo mismo que la línea cementada [243, 56, 2]. En los casos donde encontramos estas zonas hipermineralizadas en contacto con el hueso (Figura 84 y Figura 86), sí pudiera ser línea cementada. Aunque la morfología que presentan estas zonas no es lineal, sí no que forman zonas confusas más claras mezcladas con zonas

con un tono de gris similar al del hueso, todo apunta a que en estas zonas se estaría llevando a cabo la formación de nuevo hueso.

El motivo por el cual no se encontraron estas zonas intermedias entre el hueso y el recubrimiento y el hueso y la médula ósea, observadas para 5V5G y 5M5G, inducidas por el silicio liberado en el recubrimiento 7M3T, pudiera deberse a que el recubrimiento 7M3T, como vimos en la degradación *in vitro* y se observó en el estudio microscópico de las muestras implantadas *in vivo*, tiene una mayor degradación. Así pues, la línea cementada podría ser de menor espesor para 7M3T, no habiendo sido observada. Una posible explicación pudiera ser que, en un primer momento, la mayor liberación de silicio por parte de 7M3T indujera una desaceleración en la formación de esta línea cementada, reduciendo la capacidad de *bone-bonding*, como observó *in vitro* Gao en 2001 [104]. Esta mayor tasa de degradación junto con su menor espesor, favorece la rápida degradación de 7M3T, consiguiéndose la degradación total tras 8 semanas de implantación, dejando una superficie estable que facilite la neoformación ósea. Lo que no explica es por qué en zonas alejadas del endostio, donde el recubrimiento está alejado de zonas donde es posible la neoformación ósea y donde sólo está en contacto con la médula ósea, no se degrada el recubrimiento (Figura 81). También es cierto que estas zonas de nuestros recubrimientos están envueltas por cápsula fibrosa, mismo tejido que ocupa las zonas entre el recubrimiento y el hueso cortical y donde tampoco hay degradación, pudiendo afectar a la difusión y al transporte de productos de disolución, enlenteciendo la degradación de los recubrimientos en estas zonas, tal y como ya observara Radin [137]. Que la liberación de silicio debida a la degradación del recubrimiento favorezca la neoformación ósea se debatió mediante la bibliografía mostrada en la Introducción de esta Tesis; lo que no se debatió es sin embargo, qué desencadena la degradación de estos recubrimientos, puesto que según su localización, respecto a los distintos tejidos óseos, degrada o no. La médula ósea de conejo se compone de un 48,3 % de agua, un 39,7 % de lípidos, localizados dentro de los adipocitos, y un 11,9 % restante formado por el contenido celular y proteico de su matriz [245, 246]. Debido al alto contenido en agua, no debería existir impedimento para que se produjera la hidrólisis de los recubrimientos y éstos degradaran tal y como hicieran *in vitro*. Puesto que esto no sucede así, cabe plantearse que las proteínas del estroma de la médula jueguen algún papel en la inhibición de la degradación de los recubrimientos, tal y como juegan las proteínas del plasma inhibiendo el crecimiento de cristales de hidroxapatita en el suero saturado de iones [19]. Davies observó, mediante microscopía electrónica de barrido, que en las zonas de los implantes dentales en contacto con la médula ósea no había habido aposición de hueso y que la apariencia de la superficie formada era distinta y variable. La médula

ósea contiene muchas células y elementos tisulares, y es de esperar que en áreas donde el hueso no se ha formado todavía sobre la superficie del implante, otros componentes del tejido conectivo se puedan observar, especialmente fibras de colágeno. Este colágeno puede ser sintetizado por otras poblaciones celulares del estroma medular, particularmente por fibroblastos y en ausencia de hueso en estos lugares, estas fibras de colágeno no deben estar implicadas en la formación de hueso [243]. Así pues, aunque con microscopía óptica no lleguemos a observar las fibras depositadas sobre la superficie del recubrimiento que observó Davies, y tan sólo observemos la capa fibrosa a cierta distancia de la superficie tanto de los recubrimientos como del titanio, éstas pudieran existir. La aposición de estas fibras pudiera interferir en el proceso de formación de la capa de HCA en la superficie activa del recubrimiento. También, al ser zonas más alejadas y la superficie estar tapizada por fibras colágenas, la adhesión a la superficie de las citoquinas OPN y BSP pudiera verse alterada, no estimulándose ni la formación de la formación de la línea cementada, ni la formación de hueso *de novo*, ni la osteogénesis a distancia, por lo que el material no se emplearía para la formación del hueso, no degradando.

5. Conclusión

Así pues, se obtuvo una mayor degradación del recubrimiento 7M3T tanto *in vitro* como *in vivo* y, con ella, una mayor liberación de silicio. Ningún recubrimiento produjo efectos citotóxicos sobre los osteoblastos. El recubrimiento 7M3T indujo *in vitro* un comportamiento similar al del Control, induciendo, sin embargo, el recubrimiento 5M5G una gran diferenciación osteoblástica. Tras la implantación se observó un buen comportamiento del recubrimiento 7M3T con los tejidos adyacentes, con una total recuperación de la médula ósea. El resto de recubrimientos degradaron más lentamente, no consiguiendo la degradación total al final del periodo de ensayo y liberando, un menor contenido de silicio de sus redes. Aunque su interacción con los tejidos adyacentes fue también buena, la médula no consiguió recuperarse, permaneciendo muy traumatizada tras 8 semanas de implantación.

Paralelamente a la degradación del recubrimiento 7M3T se fueron formando espículas y trabéculas óseas, mediante osteogénesis a distancia, alrededor del implante, alcanzando la superficie de éste, al lograr la degradación completa del recubrimiento, sin tejido fibroso interpuesto entre el implante y el hueso. Lo mismo sucedió con el resto de recubrimientos, con la limitación de la menor degradación que estos recubrimientos mostraron *in vivo* junto con la formación de tejido fibroso interpuesto entre el hueso y el recubrimiento.

La variabilidad observada en los ensayos *in vivo* pudiera ser debida a la falta de estabilidad primaria inicial que afecta a la capacidad de osteointegración de los implantes, además de la variabilidad que toda experimentación animal conlleva *per se*. Sin embargo, se observó la formación de nuevo hueso alrededor de los implantes recubiertos con 7M3T; este recubrimiento indujo la osteogénesis a distancia a medida que se degradaba y liberaba el silicio desde su red, logrando el contacto directo hueso-implante.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS DE LA *Fase de Caracterización* II: ESTRATEGIAS DE MEJORA

Resultado de la ***Fase de Caracterización I*** fue seleccionada la formulación con el 70 % de MTMOS y el 30 % de TEOS (7M3T). Pese a que se observó un mejor comportamiento biocompatible con los tejidos y una mayor activación osteoblástica a tiempos cortos de implantación para el recubrimiento 7M3T, los datos estadísticos revelaron que el recubrimiento 7M3T no interfería en la capacidad de osteointegración de los implantes de titanio sin recubrir. Es por ello que se decidió modificar el recubrimiento 7M3T para lograr superar la capacidad de osteointegración del titanio. Las modificaciones siguieron dos estrategias, (1) añadir un tercer precursor GPTMS, con el objetivo de funcionalizar la superficie de los recubrimientos mediante apertura del anillo epoxi, manteniendo el porcentaje del 30 % de TEOS para aumentar su hidrofilia y degradación, y (2) añadirle gelatina con el objetivo de aumentar la adhesión celular al implante mediada por integrinas. La adición del tercer precursor (GPTMS) se realizó junto a los dos precursores (MTMOS y TEOS) en el momento de mezclar los alcoxisilanos.

Por lo tanto, en esta segunda fase de caracterización, los recubrimientos evaluados fueron: (1) el recubrimiento original 7M3T, (2) la modificación funcionalizada con el 0,9 % de gelatina (a la que llamaremos recubrimiento 7M3T+G) y (3) la modificación añadiendo GPTMS como tercer precursor (a la que llamaremos recubrimiento 3X).

Con el objetivo de conocer cómo estas variaciones influían en la físico-química del recubrimiento original 7M3T y en evaluar si estas modificaciones eran capaces de mejorar la respuesta biológica, estos nuevos recubrimientos fueron objeto de una caracterización completa comprendiendo: (1) la caracterización de su síntesis y deposición, (2) su caracterización físico-química y (3) una caracterización de los efectos biológicos que estos recubrimientos pudieran inducir.

1. Síntesis sol-gel y recubrimiento

Se sintetizó el recubrimiento 7M3T y los dos recubrimientos de mejora, (1) el recubrimiento 7M3T+G (formulación funcionalizada con gelatina) y (2) el recubrimiento 3X (formulación con la incorporación de GPTMS manteniendo el 30 %

de TEOS), utilizando las condiciones de síntesis, deposición y curado descritas en el Capítulo 3 (Figura 88).

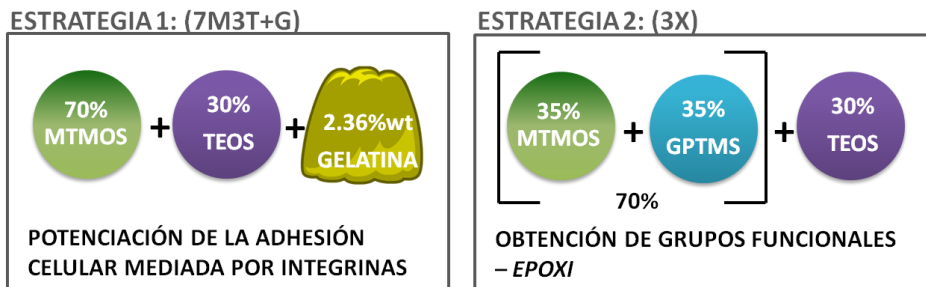


Figura 88. Estrategias de mejora de la formulación 7M3T en la *Fase de Caracterización II*; estrategia 1 de funcionalización con gelatina (izquierda) y estrategia 2 de adicionar un tercer precursor (GPTMS) manteniendo el 30 % de TEOS (derecha).

En todos los casos se obtuvo un sol transparente y sin precipitados, con una viscosidad adecuada para obtener una correcta aplicación sobre el metal. Para comprobar la distribución y homogeneidad del recubrimiento sol-gel en la superficie de los implantes, éstos se llevaron al microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) para su observación.

En esta ocasión, también el mayor espesor se registró en el fondo de los valles entre las roscas. También se pudo observar la formación de grietas en el fondo de los valles recubiertos debido al gran espesor de recubrimiento acumulado, no observándose en los discos al tratarse de espesores mucho menores. Se encontraron grietas para todos los recubrimientos, incluyendo el 7M3T, esta vez todos mostraron grietas en ambos sentidos, longitudinal y horizontal.

Los recubrimientos cubrieron toda la superficie de los implantes, influyendo éstos en la topografía de la superficie granallada del titanio. El recubrimiento 7M3T cubrió parcialmente la rugosidad del titanio, dejando intuir ésta por debajo de una fina y discontinua capa de recubrimiento; lo mismo se observó para 7M3T+G. En los implantes con el recubrimiento 3X, la rugosidad del titanio se perdió por completo, cambiando totalmente la topografía de la superficie (Figura 89).

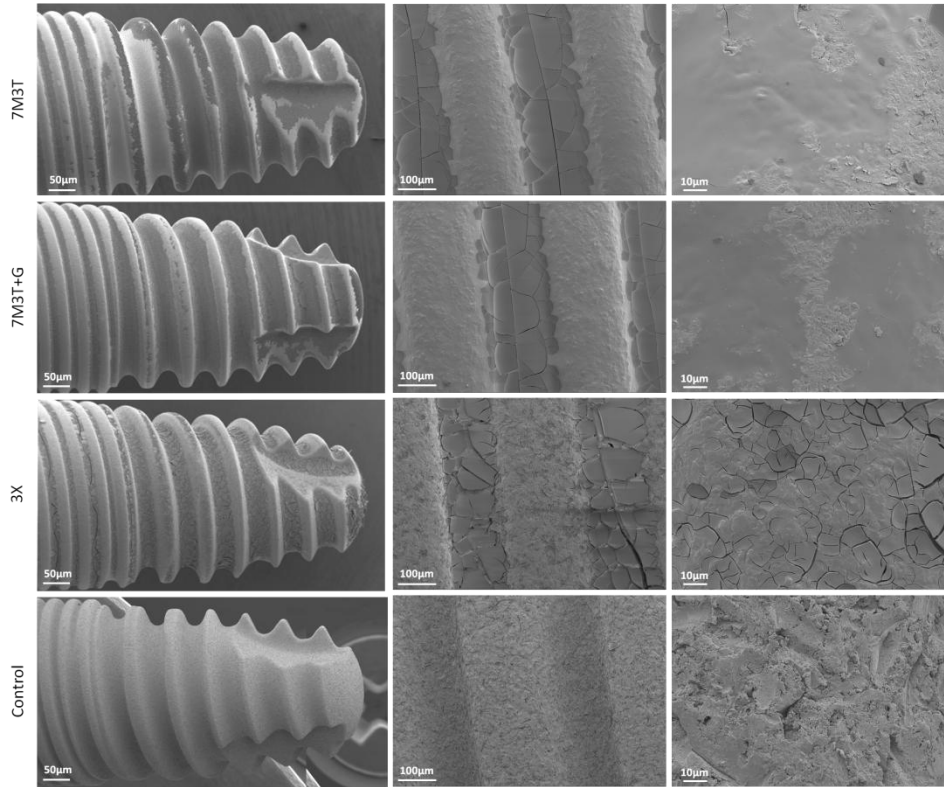


Figura 89. Imágenes de FESEM de los implantes recubiertos y el Control; implante (izquierda), detalle entre las roscas (centro) y detalle de una cresta (derecha) de la superficie del implante. Para 7M3T y 7M3T+G se observaron grietas en sentido transversal y en sentido longitudinal, para 3X la gran cantidad de grietas en ambos sentidos otorgaron un aspecto escamoso. El recubrimiento permitió intuir la superficie granallada del titanio en las crestas de las roscas para 7M3T y 7M3T+G, cubriendo parcialmente la superficie granallada del titanio (bajo derecha), siendo cubierta totalmente por el recubrimiento 3X donde también presentó el mismo aspecto escamoso que en el valle.

Durante el estudio, mediante microscopía óptica, de las secciones transversales de las muestras histológicas procedentes de la implantación *in vivo*, se pudo observar una gran variabilidad en el espesor de los recubrimientos para cada una de las formulaciones evaluadas (Figura 90). Este hecho dificultó encontrar diferencias entre los espesores de 7M3T, 7M3T+G y 3X.

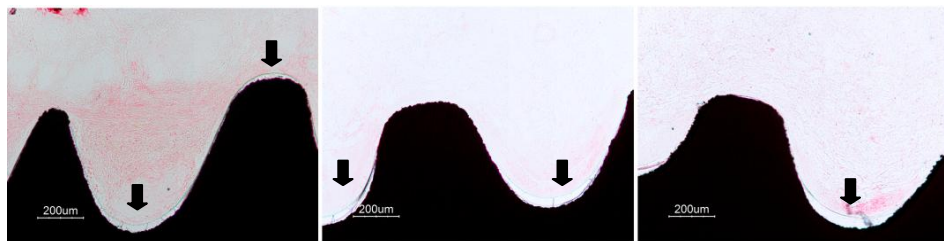


Figura 90. Imágenes de microscopía óptica (10X) de sección transversal de valles de prótesis radiculares recubiertas con las formulaciones 7M3T (izquierda), 7M3T+G (centro) y 3X (derecha) tras 1 semana de implantación en tibia proximal de conejo, (corte mediante técnica EXAKT® y tinción Tricrómica de Gomori). En el fondo de los valles se pudo observar el espesor de cada uno de los recubrimientos (flechas negras).

2. Caracterización físico-química

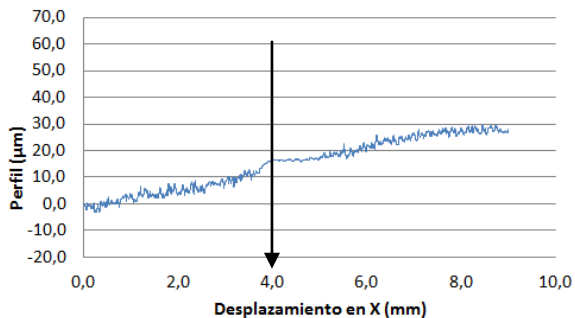
Debido a la gran importancia que las características de la superficie de los materiales tienen en la adhesión y diferenciación celular, y al igual que se hiciera con los recubrimientos evaluados en la fase experimental previa, se procedió a la caracterización físico-química de los nuevos recubrimientos. Esta caracterización se realizó con el objetivo de caracterizar la superficie de los recubrimientos sintetizados y determinar su topografía, hidrofilia, bioactividad y degradación, así como la liberación de silicio debida a la degradación hidrolítica y su adhesión al titanio.

Los sustratos empleados para estos ensayos fueron discos de titanio CP grado 4 de 12 mm de diámetro, 1,2 mm de espesor y 0,5 g de peso, con tratamiento superficial ADS® (que le confiere una rugosidad heterogénea) para los ensayos de rugosidad, hidrofilia, bioactividad y degradación. Para el ensayo de adhesión al sustrato se utilizaron prótesis radiculares comerciales GMI® modelo Frontier de 3,75 mm de diámetro y 8 mm de longitud con tratamiento ADS®. Para los ensayos de degradación y liberación *in vitro*, el personal investigador de la Universidad del País Vasco empleó cubreobjetos circulares de vidrio de 18 mm de diámetro. Los mismos discos, cubreobjetos e implantes sin recubrir fueron utilizados como control para todos los ensayos.

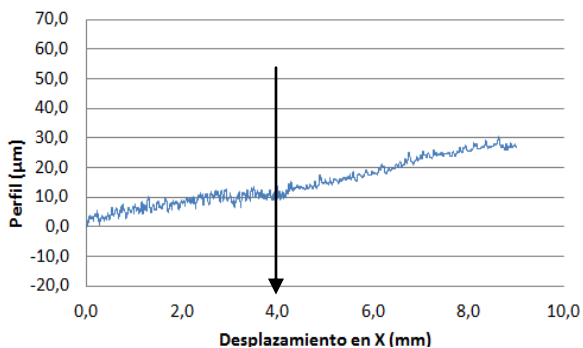
2.1. Rugosidad

Del ensayo de perfilometría se obtuvieron las gráficas que se muestran a continuación (Gráfica 22), en las cuales, las medidas a la izquierda de la flecha pertenecen a la topografía del titanio y las medidas a la derecha de la flecha al recubrimiento. Los datos numéricos derivados de estas gráficas se muestran en la

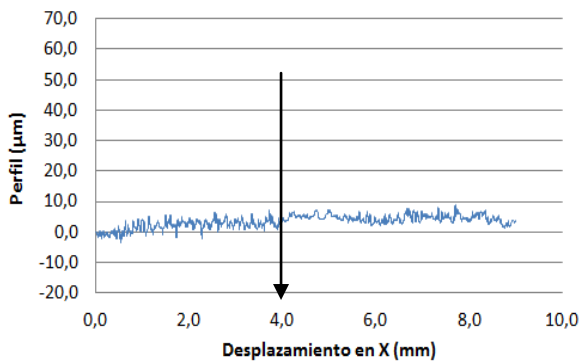
Tabla 18 en forma de porcentaje de variación de rugosidad entre cada recubrimiento y su Control.



70MTMOS:30TEOS



70MTMOS:30TEOS+0,9% gel



35MTMOS:35GPTMS:30TEOS

Gráfica 22. Perfil de línea de la superficie de los recubrimientos (de arriba abajo) de los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X (a la izquierda de la flecha) con sus correspondientes controles (a la derecha de la flecha).

Recubrimiento	Variación de la rugosidad entre el recubrimiento y el control
7M3T	-16,6%
7M3T+G	-31,8%
3X	-10,9%

Tabla 18. Porcentaje de variación de la rugosidad, medida con el perfilómetro, entre cada tipo de recubrimiento y el Control.

Este efecto sobre la superficie granallada del titanio se pudo observar mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) (Figura 91).

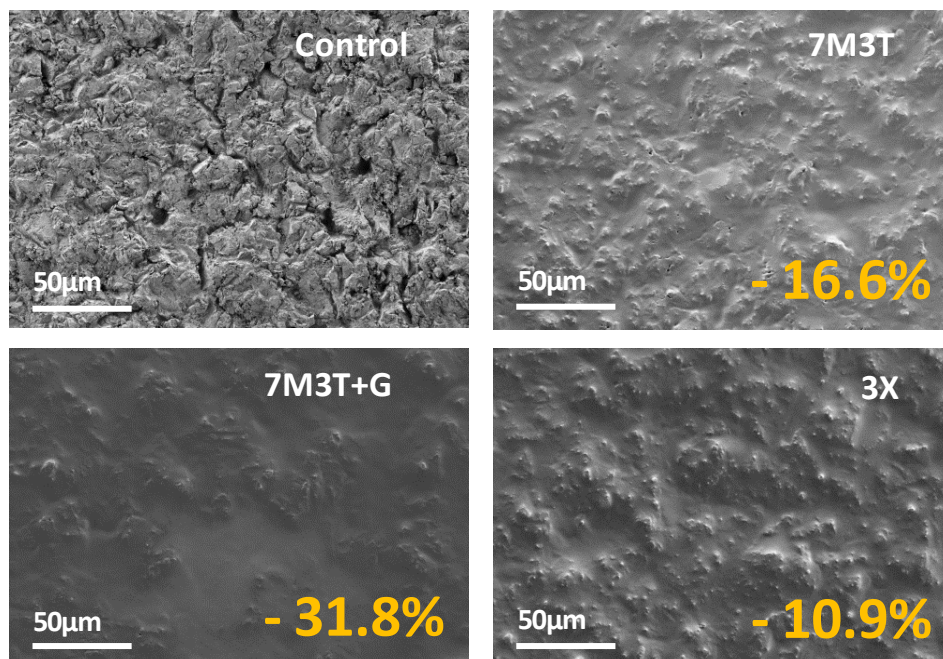


Figura 91. Imágenes de FESEM de la superficie de discos de titanio (arriba derecha) recubiertos con el material 7M3T (arriba izquierda), 7M3T+G (abajo derecha) y 3X (abajo izquierda) y el porcentaje de disminución de la rugosidad del titanio que inducen los recubrimientos.

El recubrimiento funcionalizado con gelatina fue en el que se observó un mayor efecto sobre la topografía del titanio, reduciendo su rugosidad en un 31,8 %. La presencia de moléculas de elevado peso molecular, como es la gelatina, en los recubrimientos, tiene una influencia directa en la capacidad de éstos para cambiar la topografía superficial del substrato. Sin embargo, en los implantes, el recubrimiento que más efecto tuvo sobre la topografía del titanio, perdiendo por completo la rugosidad del implante, fue el 3X.

2.2. Hidrofilia

Los valores de hidrofilia de la superficie de los recubrimientos se obtuvieron mediante medición del ángulo de contacto formado por una gota de agua sobre las distintas superficies de los recubrimientos y el Control. Como en la caracterización de los recubrimientos de la fase experimental anterior, los discos fueron recubiertos sólo a la mitad para poder tomar los valores en el recubrimiento y el titanio en la misma muestra. Para cada zona, se tomaron dos medidas (R; derecha e L; izquierda) y se realizaron tres réplicas para cada recubrimiento. Los valores de ángulo de contacto obtenidos para los distintos materiales indicaron un comportamiento más hidrófobo para el titanio, seguido del recubrimiento 7M3T y tras él 7M3T+G y finalmente 3X con el comportamiento más hidrófilo de todos los materiales (Tabla 19).

	Réplica 1				Réplica 2				Réplica 3			
	Control		Recubrimiento		Control		Recubrimiento		Control		Recubrimiento	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
7M3T	80,7	81,6	59,2	60,8	88,3	88,5	66,0	66,5	82	82,8	65,5	68,6
7M3T+G	80,3	80,8	57,2	56,8	74,2	73,2	60,0	60,5	80,3	80,6	67,4	68,2
3X	81,6	81,9	59,4	57,1	83,0	81,8	58,2	56,7	82,1	82,4	57,8	56,7

Tabla 19. Resultados de ángulo de contacto de los materiales 7M3T, 7M3T+G y 3X y sus respectivos controles.

Los valores de ángulo de contacto de los recubrimientos se encontraron próximos al rango óptimo para la adhesión celular determinado por Salzman [238]. Entre los recubrimientos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 7M3T y 3X ($p = 0,003$). Todos los recubrimientos mostraron diferencias significativas ($p = 0,000$ para todos) con el Control (Tabla 20).

Recubrimiento	Valores de hidrofilia (°)
7M3T	64,43 ± 3,63
7M3T+G	61,68 ± 4,97 *
3X	57,65 ± 1,05
Control	* 84,22 ± 3,92

Tabla 20. Medias y desviación estándar de los valores de ángulo de contacto.

Así pues, la superficie del Control mostró un carácter mucho más hidrófobo que el de cualquiera de los recubrimientos.

2.3. Degradación

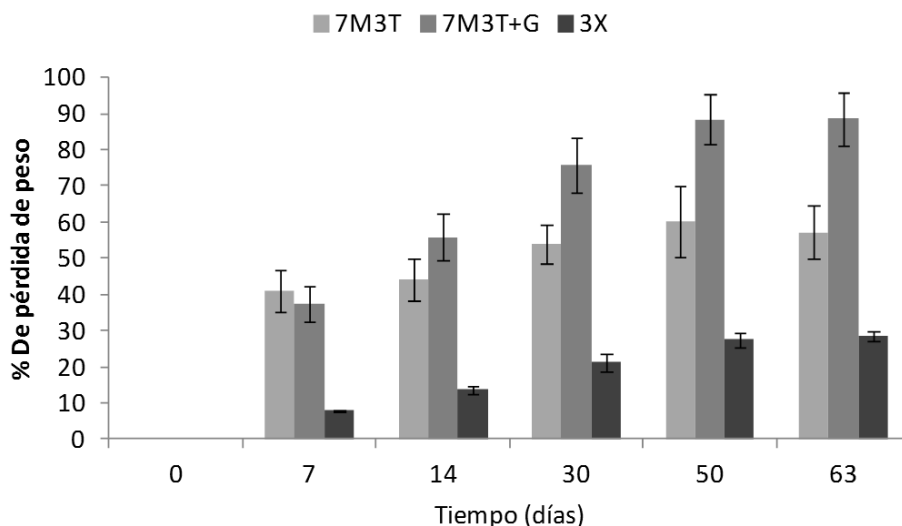
Sobre vidrio

Se llevó a cabo un estudio *in vitro* de la degradación de los recubrimientos, tal y como se describe en el Capítulo 3.

La

Gráfica 23 muestra la degradación de los recubrimientos, que fue registrada por porcentaje (%) de pérdida de peso en referencia al peso inicial a tiempo cero, tras cumplir cada uno de los periodos de toma de datos establecidos.

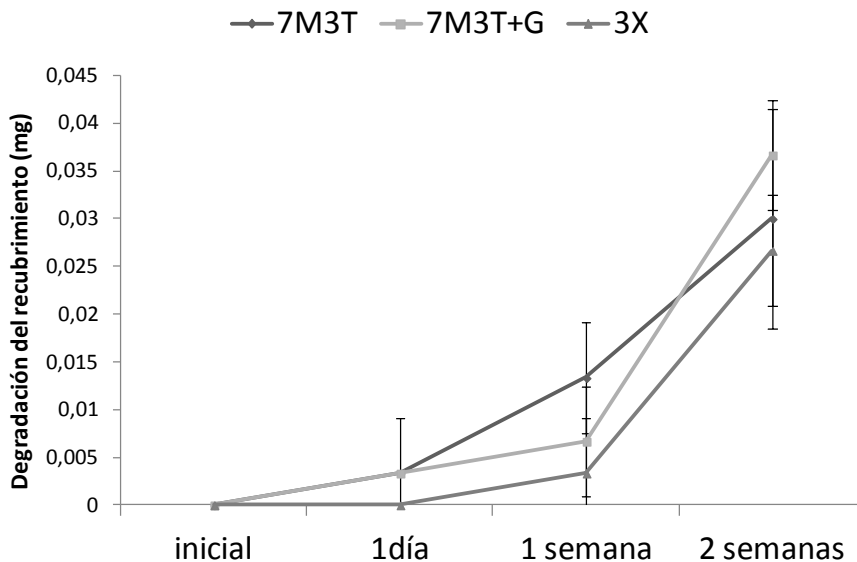
Los recubrimientos 7M3T y 7M3T+G mostraron una degradación hidrolítica inicial muy rápida, tal y como se observó ya para 7M3T, perdiendo *in vitro* casi la mitad de su peso durante la primera semana de ensayo. La pérdida de peso se estabilizó en valores cercanos al 55 – 60 % después de 30 días de inmersión para la formulación 7M3T. Sin embargo, la degradación del recubrimiento 7M3T+G aumentó con el tiempo de forma continua, alcanzando casi el 100 % de degradación a 50 y 63 días. El recubrimiento 3X presentó la menor degradación inicial, no alcanzando el 10 % a 7 días de inmersión. Sin embargo, esta degradación fue aumentando progresivamente hasta alcanzar una pérdida de peso del 30 % a los 63 días.



Gráfica 23. Datos de porcentaje (%) de pérdida de peso respecto al valor inicial para los materiales 7M3T, 7M3T+G y 3X.

Sobre titanio

En esta ocasión, el ensayo de degradación se realizó con los discos de titanio granallados recubiertos, idénticos a aquellos utilizados para los ensayos celulares. Los discos se pesaron inicialmente y tras permanecer 7 y 14 en agua ultrapura a 37 °C. Los pesos se registraron y, mediante la diferencia de éstos con el peso inicial, y con estos datos se realizó la Gráfica 24.



Gráfica 24. Diferencia de pesos para determinación de la degradación *in vitro* sobre discos de titanio granallado recubiertos con las formulaciones 7M3T, 7M3T+G y 3X y el Control.

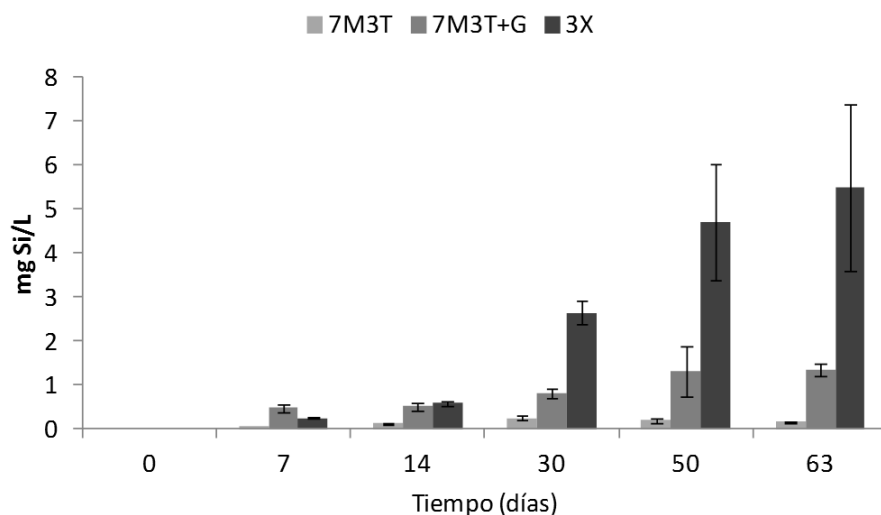
Los resultados del ensayo muestran que, aunque el recubrimiento 7M3T mostró una degradación más rápida, todos los recubrimientos alcanzaron finalmente el mismo grado de degradación tras inmersión en agua pura, ya que no se pudo observar diferencias estadísticamente significativas en el ensayo.

En ambos ensayos de degradación, con distintos sustratos, se pudo observar que tras 14 días la mayor degradación fue para 7M3T+G y 7M3T. Sin embargo, los valores para la degradación, que sobre titanio fueron similares a los de los demás recubrimientos, sobre vidrio mostraron una degradación menor. Recordar que además de la diferencia de sustratos, las técnicas de deposición en ambos ensayos también fueron diferentes, *drop-coating* para el vidrio (deposición de una gota de recubrimientos) y *dip-coating* para el titanio (deposición por inmersión). Esta diferencia pudiera influir en el espesor del recubrimiento sobre los diferentes sustratos, además de la diferente adhesión del recubrimiento al sustrato y su diferente bioquímica superficial.

2.4. Liberación

Con el objetivo de registrar la liberación de silicio debida a la degradación hidrolítica de los recubrimientos, se llevó a cabo un ensayo de detección del silicio contenido en la disolución de degradación tras distintos periodos de ensayo.

Los valores de liberación para 7M3T, representados en la Gráfica 25, fueron muy bajos comparados con el resto de materiales, alcanzando su máximo tras un mes de ensayo, pero sin alcanzar si quiera los 0,5 mg Si/L. Tras una semana de ensayo, los mayores valores de liberación los presentó el recubrimiento 7M3T+G, cuya liberación se mantuvo tras dos semanas de ensayo, aumentando con el tiempo hasta doblar la cantidad de silicio liberado al finalizar. Para el recubrimiento 3X se registró una liberación de silicio menor que la de 7M3T+G tras una semana de ensayo. Al cumplir las dos semanas de ensayo, el recubrimiento 3X había liberado la misma cantidad de silicio al medio que 7M3T+G, pero, tras este periodo, los valores de liberación de 3X se triplicaron tras un mes de ensayo, aumentando progresivamente hasta el final.



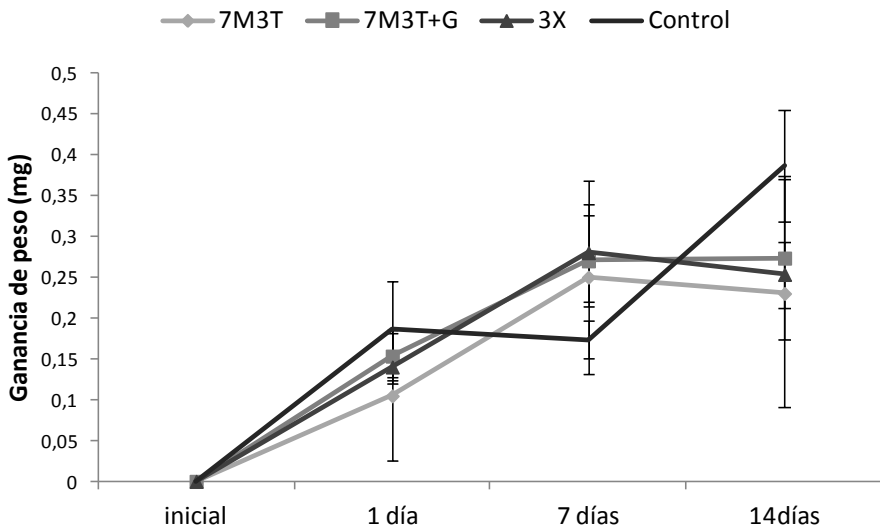
Gráfica 25. Liberación de silicio (mg Si/L) debida a la degradación hidrolítica de los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X tras determinados periodos de ensayo.

Contrariamente a lo esperado, se obtuvieron mayores valores de liberación de silicio en el medio para el recubrimiento de menor tasa de degradación, es decir para 3X. El recubrimiento con mayor tasa de degradación observada, 7M3T+G, mostró una liberación moderada. Aunque el material 7M3T mostró degradación con el tiempo, la tasa de liberación de silicio fue mínima.

2.5. Bioactividad

Debido al contenido de silicio de los recubrimientos, se realizó un ensayo para comprobar la reactividad de sus superficies. Para ello, se realizó un ensayo de bioactividad *in vitro*, en el cual los discos recubiertos y los discos Control fueron sumergidos en fluido corporal simulado (27-Tris-SBF) durante los tiempos correspondientes a los empleados para los ensayos celulares, de 7 y 14 días.

En la Gráfica 26 se representa la ganancia de peso de los discos con el tiempo, debido a la formación de esferas y cristales de hidroxiapatita sobre la superficie de las muestras, indicativo de bioactividad de éstas.



Gráfica 26. Ganancia de peso de las muestras (mg) tras inmersión en 27-Tris-SBF para determinar la bioactividad *in vitro* de los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X sobre discos de titanio granallado y Control.

Todos los recubrimientos siguieron la misma tendencia, aumentando su peso hasta 7 días, estabilizándose a partir de este momento. El Control, por el contrario, estabiliza su peso durante la primera semana, mostrando el aumento de peso durante la segunda semana. Pese a las diferencias observadas en la gráfica, el estudio estadístico no mostró diferencias significativas entre los recubrimientos y el Control.

Para comprobar que esta ganancia de peso estaba directamente relacionada con la nucleación de hidroxiapatita, y por tanto con la bioactividad de la superficie, y no tan sólo con la precipitación de las sales de la disolución, las muestras se secaron y fueron llevadas al FESEM para la observación de su superficie. En las imágenes de FESEM de la superficie de las muestras tras 14 días sumergidas en fluido corporal

simulado, se pudo observar cómo, sobre la superficie del Control, se formaron precipitados de sales distribuidos homogéneamente sobre toda la superficie. Sin embargo, sobre los recubrimientos, además de observar precipitados, pudimos observar la formación esférica de hidroxiapatita formando racimos (Figura 92). Estos racimos se desarrollaron más frecuentemente sobre precipitados de sales, que otorgaron cierta topografía a las superficies de los recubrimientos.

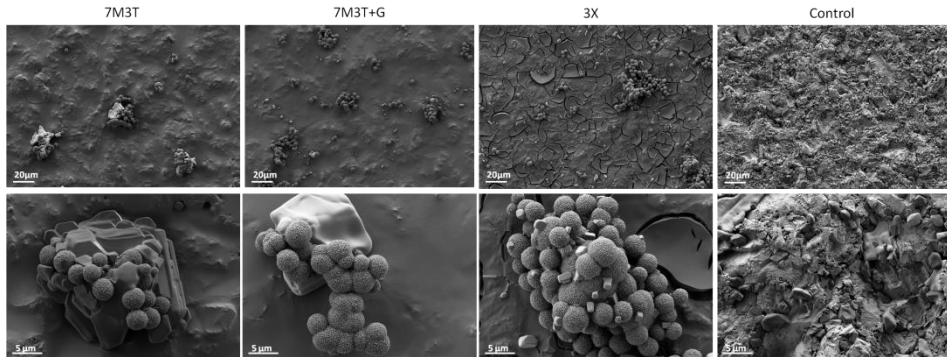


Figura 92. Imágenes de FESEM de la formación de hidroxiapatita en esferas sobre la superficie recubierta de discos de titanio granallados y precipitados de sales sobre los discos Control (sin recubrir). Se puede observar cómo sobre 7M3T, 7M3T+G y 3X también se forman precipitados de sales sobre los cuales se desarrollaron los racimos de esferas de hidroxiapatita.

La hidrolización de los grupos silanoles es mucho más factible que la de los grupos tianoles de la superficie del titanio, es por ello que los recubrimientos poseen la capacidad de nuclear hidroxiapatita en su superficie, mientras que la superficie del titanio no muestra esta capacidad, recubriéndose con precipitados de las sales del fluido corporal simulado [225].

Los resultados parecieron indicar una escasa bioactividad de los recubrimientos, ya que los datos procedentes de ensayos similares en el campo de los biomateriales muestran superficies cubiertas con colonias de “coliflores” de hidroxiapatita que con el tiempo van fusionándose hasta cubrir totalmente la superficie formando una capa homogénea [111, 225]. En este ensayo, debe tenerse en cuenta que el volumen de líquido corporal simulado utilizado correspondió al mismo volumen empleado para los cultivos celulares, buscando una correlación con éstos, es decir un volumen de 1 ml, por lo que la escasez de bioactividad pudo deberse a la insuficiencia de iones Ca^{2+} y P^+ disponibles en la solución.

2.6. Adherencia al sustrato

Como se comentó en el mismo apartado del capítulo anterior, la evaluación de la adherencia al sustrato es imprescindible tratándose de recubrimientos sobre

implantes óseos. Para comprobar si la adherencia al sustrato de nuestros recubrimientos era correcta para su aplicación en hueso, en este caso, se realizó un ensayo de resistencia al proceso de implantación utilizando el mismo modelo animal empleado para la experimentación *in vivo*. Las prótesis fueron implantadas manualmente con una llave de carraca dinamométrica, aplicando un par de apriete entre 35 – 40 N*cm y un máximo de 60 N*cm, según protocolo quirúrgico descrito para la **Fase de Caracterización II**. Las muestras se procesaron, como se indica en el Capítulo 3, para su observación al microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM). En este caso, los recubrimientos sólo tuvieron que soportar el proceso de implantación, tal y como sucediera en clínica. De la comparación entre las prótesis, antes y después de la implantación, se pudo determinar que los recubrimientos resistieron el proceso de implantación quirúrgica en hueso (Figura 93).

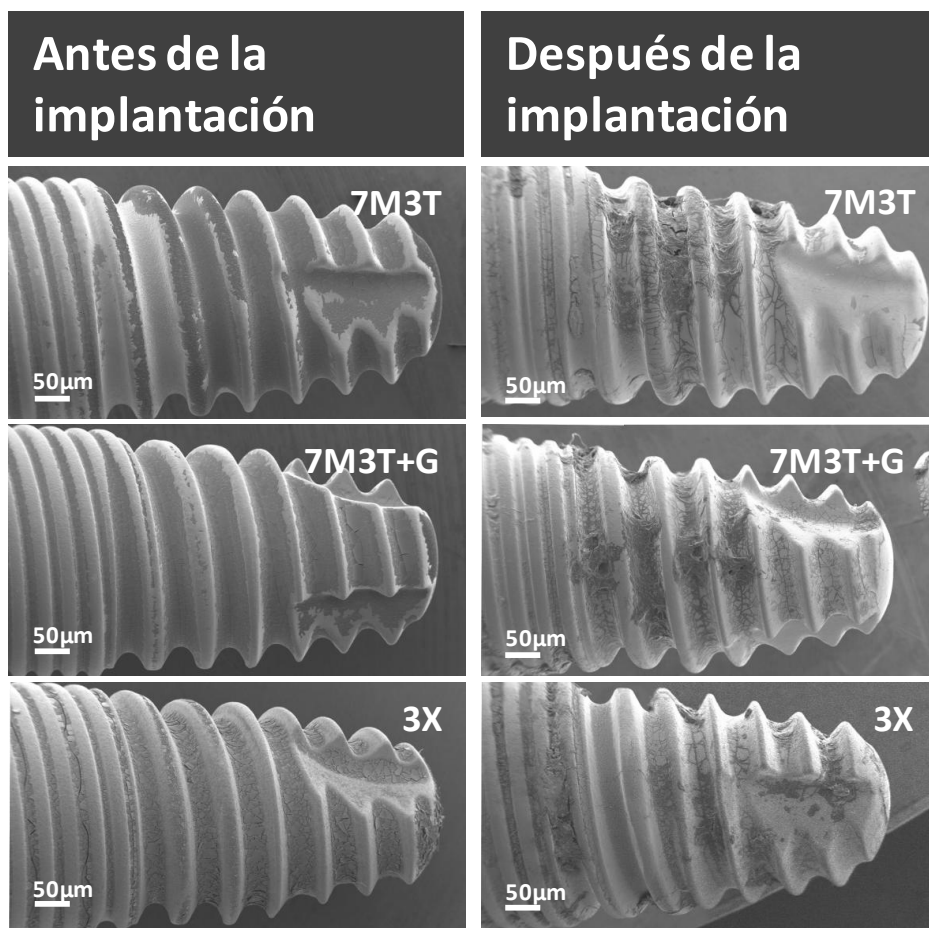


Figura 93. Imágenes de FESEM que demuestran la resistencia de los recubrimientos al proceso de implantación quirúrgica *in vivo*, se observa cómo el recubrimiento antes (columna de la izquierda) y después de la implantación (columna de la derecha) permanece íntegro.

Los implantes no fueron lavados cuando se extrajeron para evitar desprendimientos del recubrimiento no debidos al proceso de implantación, es por ello que en las imágenes de la columna de la derecha de la Figura 93 las prótesis muestran coágulos sanguíneos adheridos a la superficie. Los recubrimientos permanecieron intactos.

3. Caracterización biológica

Tal y como se mostrara en el capítulo anterior, una vez evaluadas las características físico-químicas de los recubrimientos, se procedió a caracterizar cómo éstas influían en el comportamiento celular de preosteoblastos en cultivo y sobre los tejidos vivos. En este apartado se muestran los resultados obtenidos para los distintos ensayos que se realizaron para caracterizar el comportamiento celular y tisular que indujeron los distintos recubrimientos.

Para la caracterización biológica de los recubrimientos de la **Fase de Caracterización II** se utilizaron como soporte, como en la fase anterior, titanio puro CP grado 4 con tratamiento superficial ADS®. Este titanio sirvió como soporte de ensayo en forma de discos para los ensayos *in vitro* y en forma de prótesis radiculares comerciales para los ensayos *in vivo*, tal y como se hiciera para la **Fase de Caracterización I**. Los mismos discos e implantes sin recubrir fueron utilizados como control para todos los ensayos.

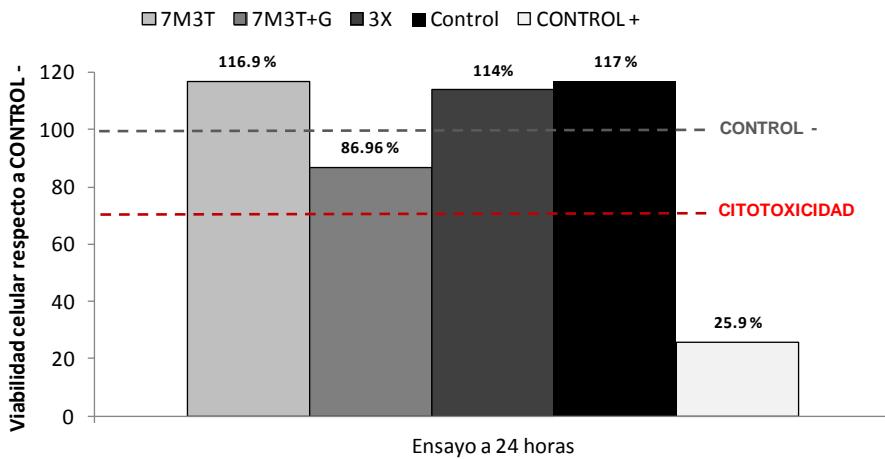
3.1. Evaluación biológica sobre cultivo celular

Con el objetivo de determinar cómo afectan los distintos recubrimientos al comportamiento de preosteoblastos, se realizaron ensayos de citotoxicidad y viabilidad, adhesión, proliferación y diferenciación.

3.1.1. Citotoxicidad por extracto

Con el objetivo de conocer los posibles efectos tóxicos de los recubrimientos sobre los preosteoblastos, se cuantificó el porcentaje de viabilidad celular respecto al Control – para citotoxicidad (Thermanox®), tras 24 horas. En la Gráfica 27 se muestran estos porcentajes de viabilidad celular medidos por densidad óptica resultante del ensayo con MTS (protocolo descrito en el Capítulo 3).

Ninguno de los recubrimientos seleccionados demostró tener ningún efecto tóxico sobre los osteoblastos, tal y como se muestra en la Gráfica 27, ya que todos ellos indujeron una viabilidad mayor del 70 % respecto al Control – (Thermanox®).

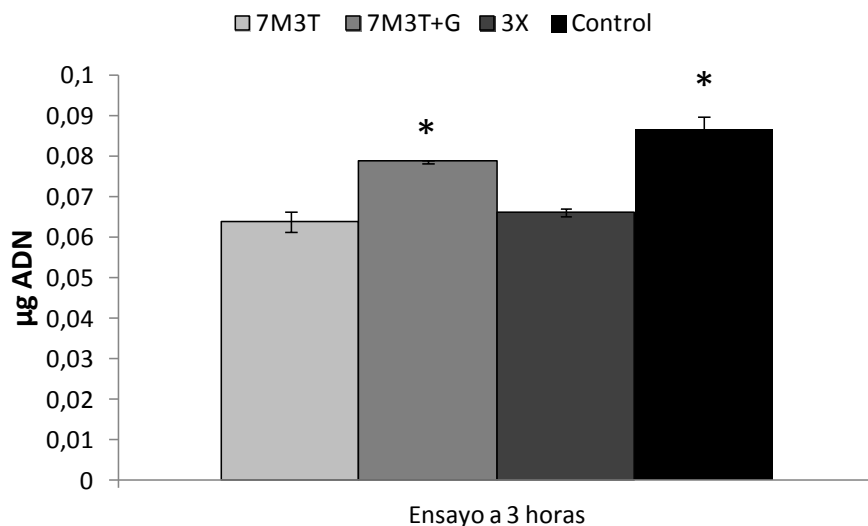


Gráfica 27. Datos de porcentaje de viabilidad celular respecto al CONTROL - (Thermanox®) para los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X y para el titanio (Control).

3.1.2. Adhesión

Para determinar la capacidad de los recubrimientos de inducir la adhesión de los preosteoblastos sobre su superficie, se realizó un ensayo de adhesión mediante MTS, se observó la morfología celular sobre la superficie de los recubrimientos mediante FESEM, se realizaron ensayos inmunocitoquímicos para proteínas de adhesión e integrinas y se determinó la expresión del gen Fak mediante RT-PCR (protocolos descritos en el Capítulo 3).

En la Gráfica 28 se muestran los valores de adhesión de preosteoblastos sobre los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X y sobre el Control, mediante cuantificación de ADN (μg ADN) con MTS. El ensayo de adhesión tras 3 horas de incubación mostró que la adhesión celular fue significativamente mayor para el titanio (Control-7M3T $p = 0,001$, Control-7M3T+G $p = 0,012$, Control-3X $p = 0,000$), seguido de 7M3T+G (7M3T+G-7M3T $p = 0,000$, 7M3T+G-3X $p = 0,000$). Los recubrimientos 7M3T y 3X indujeron una menor adhesión, no mostrando diferencias entre ellos. En este caso, los valores de hidrofilia y adhesión de los recubrimientos y el Control parecieron no respaldar la hipótesis de Salzman [238].



Gráfica 28. Ensayo de adhesión de preosteoblastos sobre los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X y sobre el Control.

Mediante las imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) se observó que los preosteoblastos adheridos sobre el recubrimiento 7M3T presentaron, igual que lo hicieran en la fase anterior, una adhesión a la superficie mediante escasos filopodios. Menor adhesión al sustrato presentaron los preosteoblastos al recubrimiento 7M3T+G, sin embargo sobre el recubrimiento 3X se observaron citoplasmas más extendidos con mayores puntos de adhesión al sustrato. La morfología del citoesqueleto de los preosteoblastos en cultivo sobre el titanio se mostró más estrellada, con mayor número de anclajes al sustrato (Figura 94).

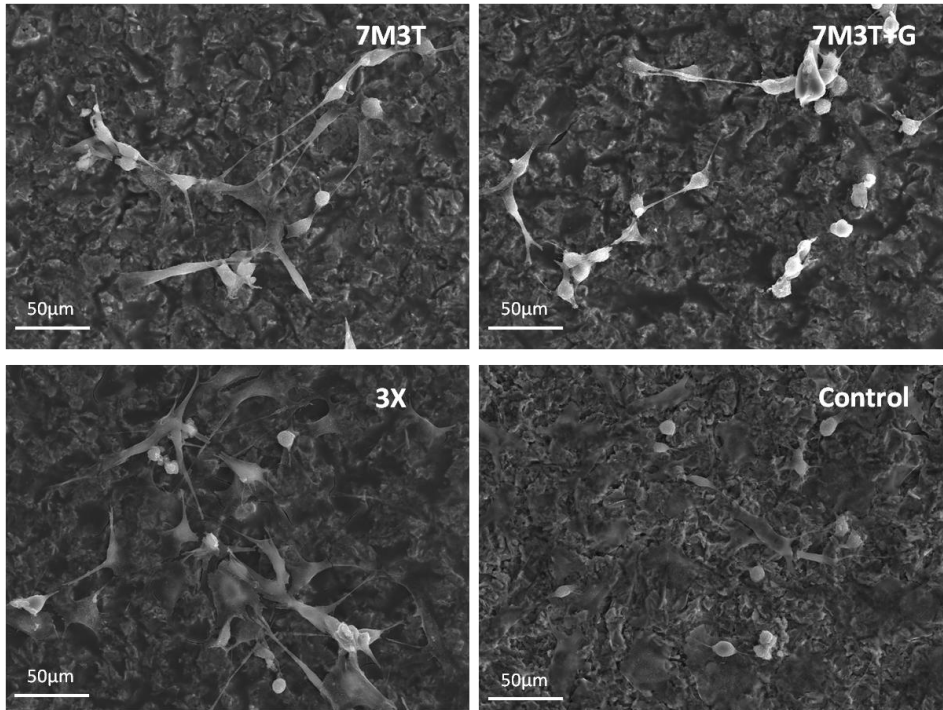
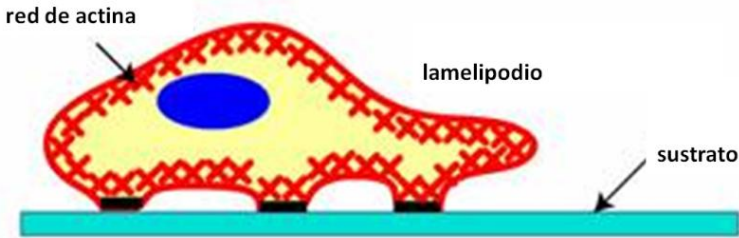


Figura 94. Imágenes de FESEM de adhesión preosteoblástica a 3 horas sobre los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X y el Control.

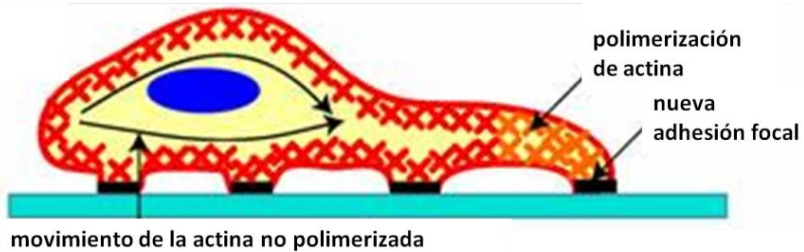
El citoesqueleto celular es una compleja red interna de filamentos proteicos que se extiende a través del citoplasma de las células, mediante la cual proporciona estructura y soporte a las células eucariotas, permitiéndoles asumir una gran variedad de formas y soportar las fuerzas que actúan sobre ellas. El citoesqueleto también proporciona la fuerza motriz necesaria para el movimiento celular (migración). El citoesqueleto está compuesto principalmente por tres tipos de filamentos; filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos. Todos ellos son polímeros compuestos por numerosas subunidades, lo que permite un ensamblaje y desensamblaje rápidos de los filamentos, mediante adición o sustracción de subunidades, de acuerdo con los requisitos celulares para cada situación. En las fases iniciales de la migración celular, los monómeros de actina son añadidos a los filamentos de actina del borde delantero de la célula, borde de ataque. De esta manera el filamento de actina crece en la dirección del movimiento de la célula, empujando la membrana plasmática hacia delante (protrusión) y a menudo formando una estructura llamada lamelipodio. El lamelipodio está anclado al sustrato mediante la formación de complejos de adhesión focal los cuales, de uno en uno, permiten a la célula generar tracción y tirar de sí misma hacia delante (tracción). Al mismo tiempo, la célula despega su parte posterior, borde de salida, y los monómeros son eliminados de

la parte trasera del filamento de actina, contrayéndose el cuerpo principal de la célula (Figura 95). La continua polimerización de filamentos de actina es requerida para producir movimiento celular y estos filamentos de actina deben estar conectados a la membrana plasmática o a complejos de adhesión [247, 229, 248].

Protusión del borde de ataque



Adhesión del borde de ataque



Despegue del borde de salida y tracción

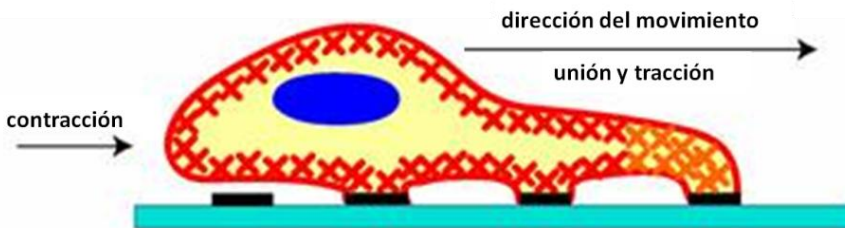


Figura 95. Esquema del proceso de migración celular (modificado de [249]).

Cuando la membrana es incapaz de adherirse al sustrato, la protusión de la membrana se repliega en la célula, produciéndose una ondulación del borde de ataque llamada *ruffling* [248]. Por lo tanto, el estudio de las proteínas de adhesión que median la formación de complejos de adhesión y la formación de adhesiones focales, así como el estudio del citoesqueleto de actina de la célula, nos otorgan gran información sobre la calidad de su adhesión y su capacidad de migrar activamente.

La regulación de la organización y dinámica de los filamentos de actina es compleja y está estrechamente controlada por un grupo de GTPasas monoméricas que pertenecen a la familia de proteínas Rho: RhoA, que regula la formación de fibras de estrés de actina (imagen B de la Figura 96) Rac, que regula la formación de los lamelipodios (imagen C de la Figura 96) y Cdc42, que regula la formación de filopodios (imagen D de la Figura 96) [247, 248].

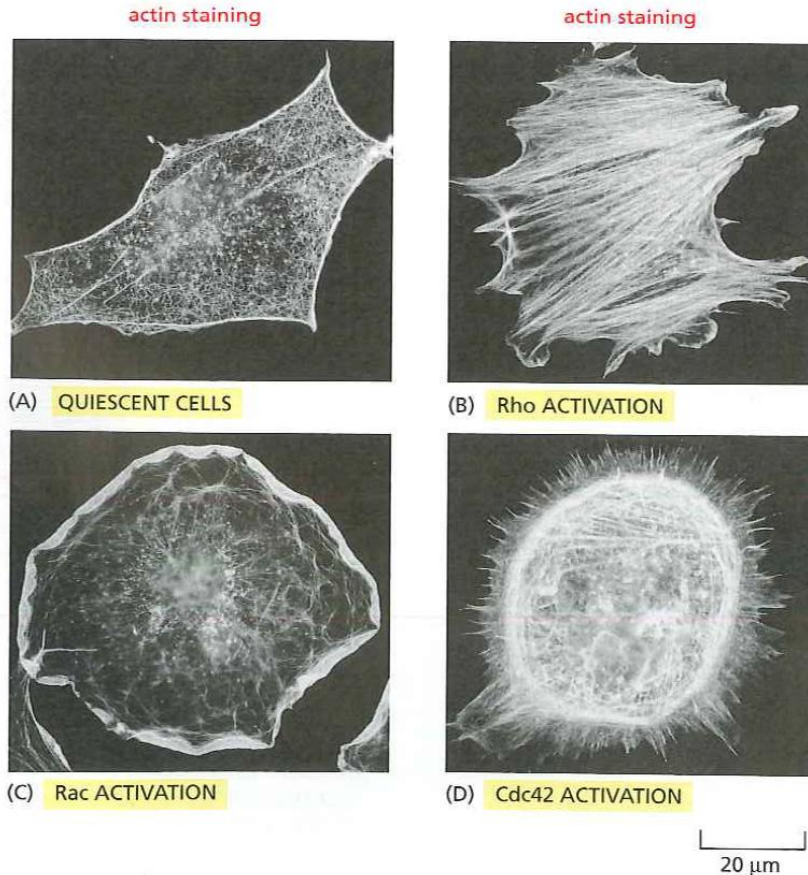


Figura 96. Imágenes de microscopía de fluorescencia tras marcaje del esqueleto de actina con faloidina para observar los efectos de Rac, RhoA y Cdc42 en la organización de actina en fibroblastos. (B) La microinyección de una forma constitutivamente activada de RhoA provoca el ensamblaje de muchas fibras de estrés prominentes; (C) La microinyección de una forma constitutivamente activada de Rac provoca la formación de un enorme lamelipodio se extiende por toda la circunferencia de la célula; (D) La microinyección de una forma constitutivamente activada de Cdc42 provoca la protrusión de numerosos filopodios largos en la periferia celular (imagen de [250] en [248]).

Con el objetivo de corroborar lo observado mediante FESEM y profundizar en la capacidad de los recubrimientos para inducir la adhesión de preosteoblastos, se realizaron una serie de ensayos adicionales. Se realizó un ensayo inmunocitoquímico

de algunas de las integrinas más importantes que median la formación de complejos de adhesión celular, tales como la integrina α_v , la integrina α_5 y la integrina β_1 y las proteínas citoplasmáticas: vinculina, talina y tensina. Este anclaje de las células a la superficie de los implantes a través de la formación de los complejos de adhesión celular es regulado por quinasas tales como la quinasa de adhesión focal (FAK), tal y como se explicó en la Introducción. Por ello, también se realizó un estudio comparativo de la expresión del gen Fak, que en ratón codifica la proteína quinasa de adhesión focal (FAK), mediante reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción inversa (RT-PCR).

En los ensayos complementarios de adhesión se incluyó el material 5M5G de la **Fase de Caracterización I**, puesto que en la primera fase no hubo oportunidad de realizar estas técnicas.

Los resultados de los ensayos para todas las proteínas de adhesión y las integrinas fueron, como cabía esperar, iguales, otorgando un mayor peso a los resultados obtenidos. Todos los sustratos permitieron la adhesión celular, sin embargo la calidad de esta adhesión fue algo distinta. Las imágenes de fluorescencia mostraron unos preosteoblastos de pequeño tamaño para los recubrimientos 7M3T y 7M3T+G, con un citoplasma poco extendido y, en muchas ocasiones bordes rizados (*ruffling*), observándose escasos lamelipodios. Esto es indicativo de que la célula no puede desplazarse por el sustrato debido a la baja calidad de su adhesión. Para los demás recubrimientos (3X y 5M5G) y el Control (titanio) los preosteoblastos presentaron citoplasmas de mayor tamaño con una mayor organización de los filamentos de actina, otorgándoles forma estrellada. En estos casos, los bordes no se mostraron ondulados si no que se observó la formación de filopodios y lamelipodios, así como fibras de estrés. El citoesqueleto de actina de los preosteoblastos sobre los recubrimientos 3X tendió más hacia la formación de filopodios, mientras que el recubrimiento 5M5G inducía mayor formación de fibras de estrés. Sin embargo, ningún sustrato (ni el titanio) indujo una adhesión como la del Control + (Thermanox®), sobre cuya superficie se encontraron preosteoblastos con citoplasmas muy extendidos (forma estrellada), con multitud de lamelipodios y filopodios, y fibras de estrés, indicativas de adhesiones focales maduras (para vinculina ver Figura 97; para talina ver Figura 98; para tensina ver Figura 99; para integrina α_5 ver Figura 100; para integrina α_v ver Figura 101 y para integrina β_1 ver Figura 102).

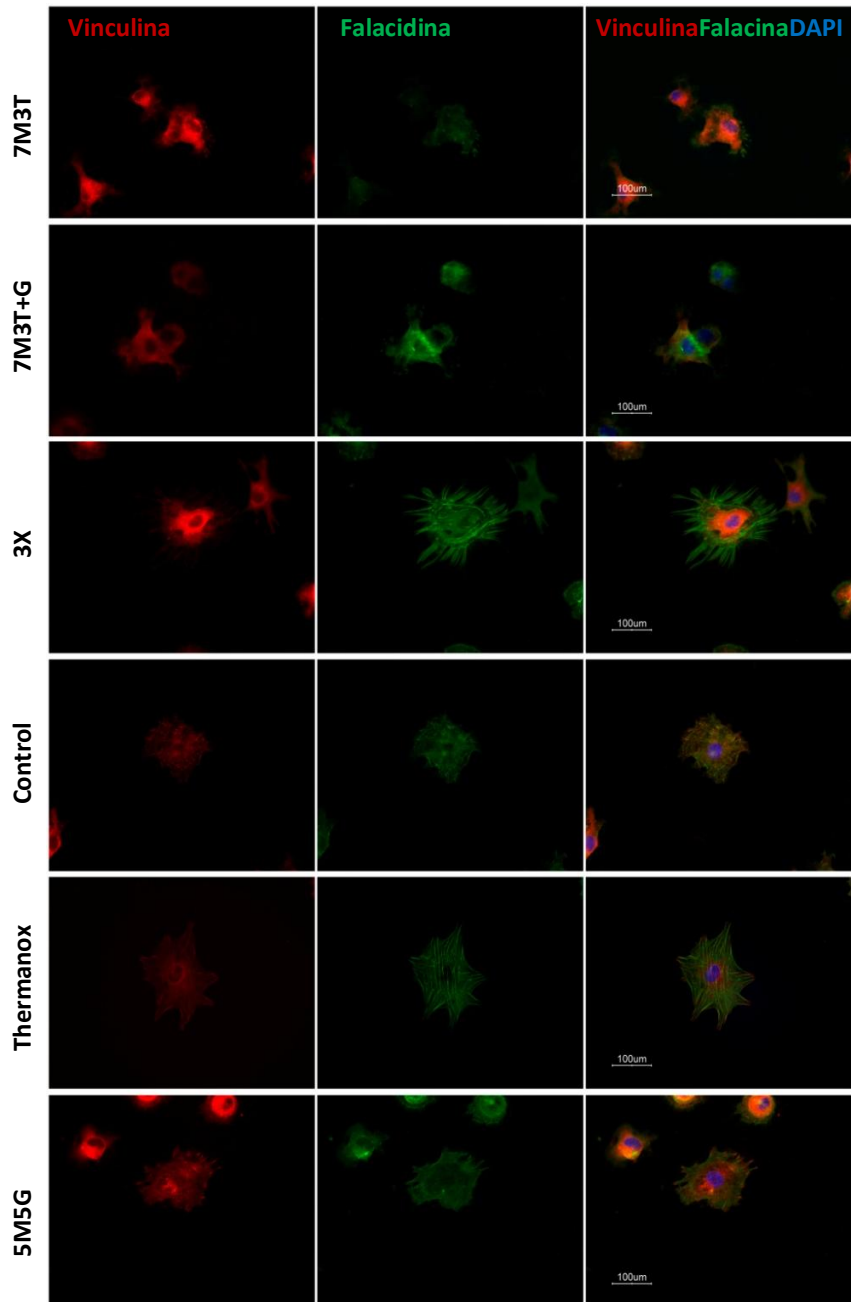


Figura 97. Inmunocitoquímica de proteínas de adhesión a 3 horas de cultivo con preosteoblastos sobre discos de titanio recubiertos con las formulaciones 7M3T, 7M3T+G, 3X y 5M5G, además de para el Control (titanio sin recubrir) y el Control + (Thermanox®); marcaje de vinculina (columna de la izquierda, rojo); marcaje de actina del citoesqueleto con falacidina (columna central, verde), marcaje de vinculina (rojo), citoesqueleto (verde) y núcleos con DAPI (azul) (columna de la derecha).

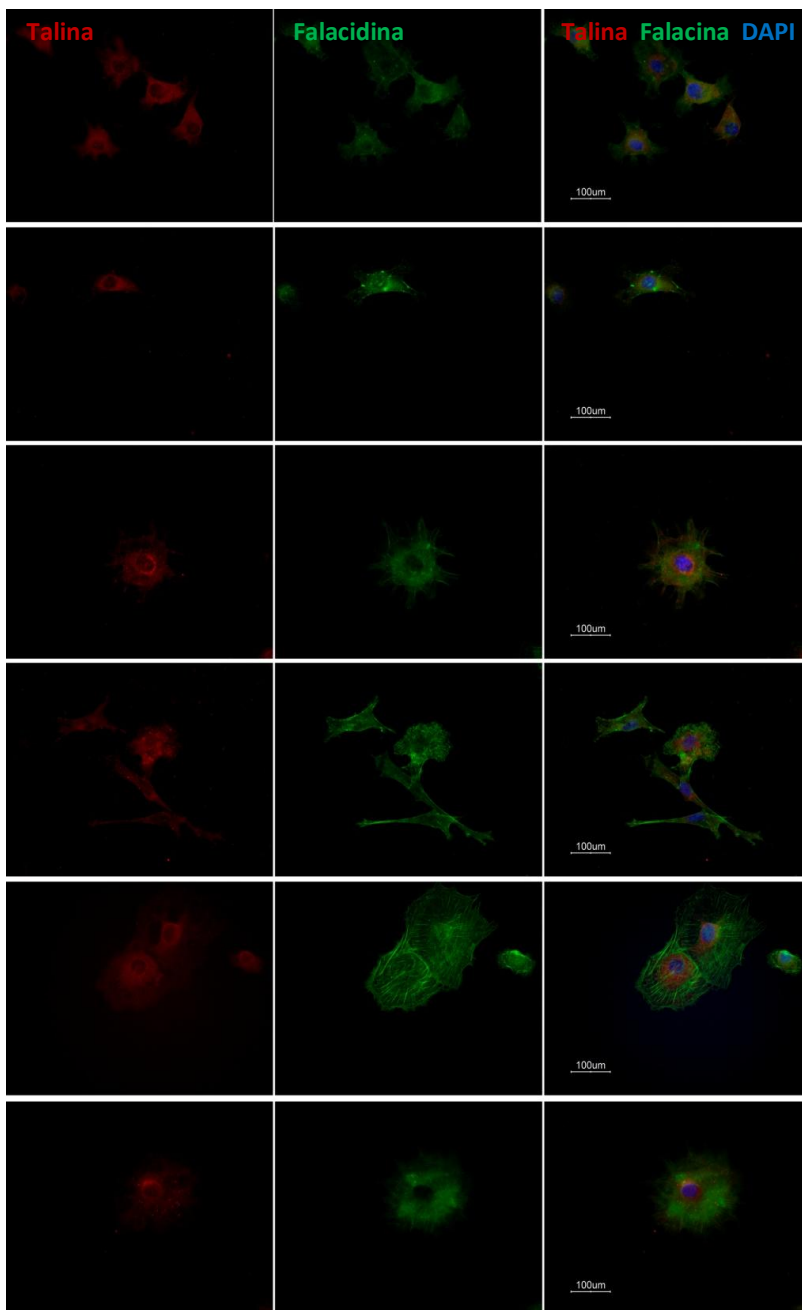


Figura 98. Inmuncitoquímica de proteínas de adhesión a 3 horas de cultivo con preosteoblastos sobre discos de titanio recubiertos con las formulaciones 7M3T, 7M3T+G, 3X y 5M5G, además de para el Control (titanio sin recubrir) y el Control + (Thermanox®); marcaje de talina (columna de la izquierda, rojo); marcaje de actina del citoesqueleto con falacidina (columna central, verde), marcaje de talina (rojo), citoesqueleto (verde) y núcleos con DAPI (azul) (columna de la derecha).

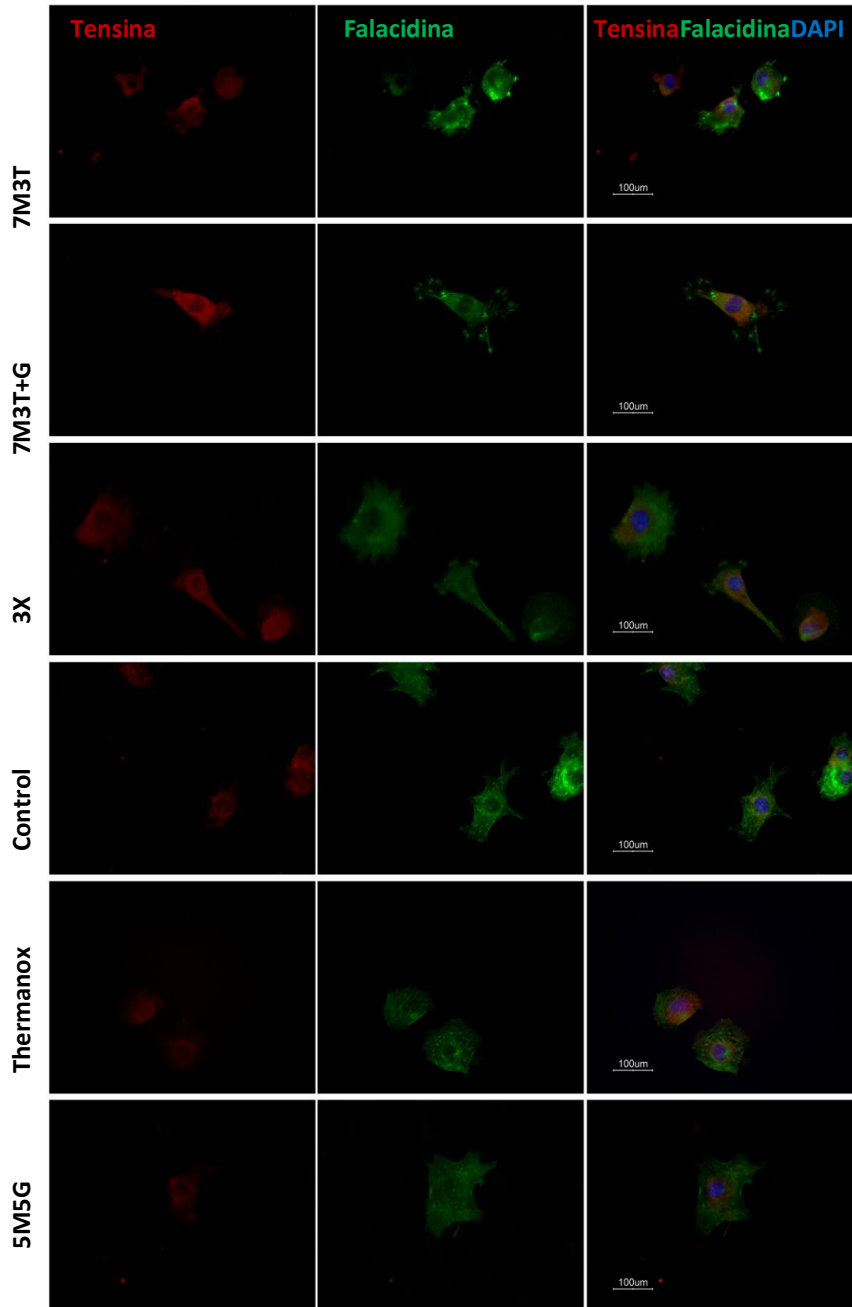


Figura 99. Inmunocitoquímica de proteínas de adhesión a 3 horas de cultivo con preosteoblastos sobre discos de titanio recubiertos con las formulaciones 7M3T, 7M3T+G, 3X y 5M5G, además de para el Control (titanio sin recubrir) y el Control + (Thermanox®); marcaje de tensina (columna de la izquierda, rojo); marcaje de actina del citoesqueleto con falacidina (columna central, verde), marcaje de tensina (rojo), citoesqueleto (verde) y núcleos con DAPI (azul) (columna de la derecha).

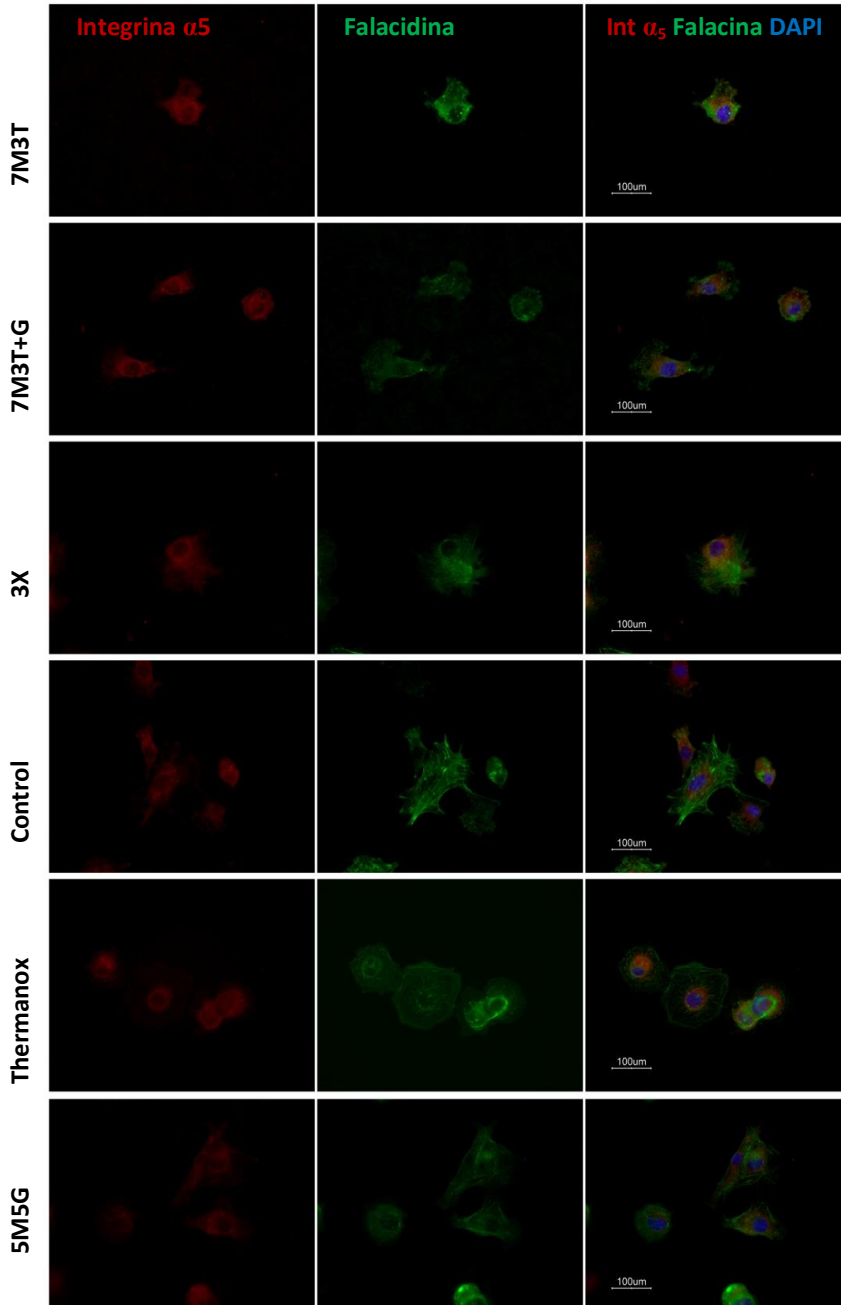


Figura 100. Inmunocitoquímica de integrinas a 3 horas de cultivo con preosteoblastos sobre discos de titanio recubiertos con las formulaciones 7M3T, 7M3T+G, 3X y 5M5G, además de para el Control (titanio sin recubrir) y el Control + (Thermanox®); marcaje de integrina α_5 (columna de la izquierda, rojo); marcaje de actina del citoesqueleto con falacina (columna central, verde), marcaje de integrina α_5 (rojo), citoesqueleto (verde) y núcleos con DAPI (azul) (columna de la derecha).

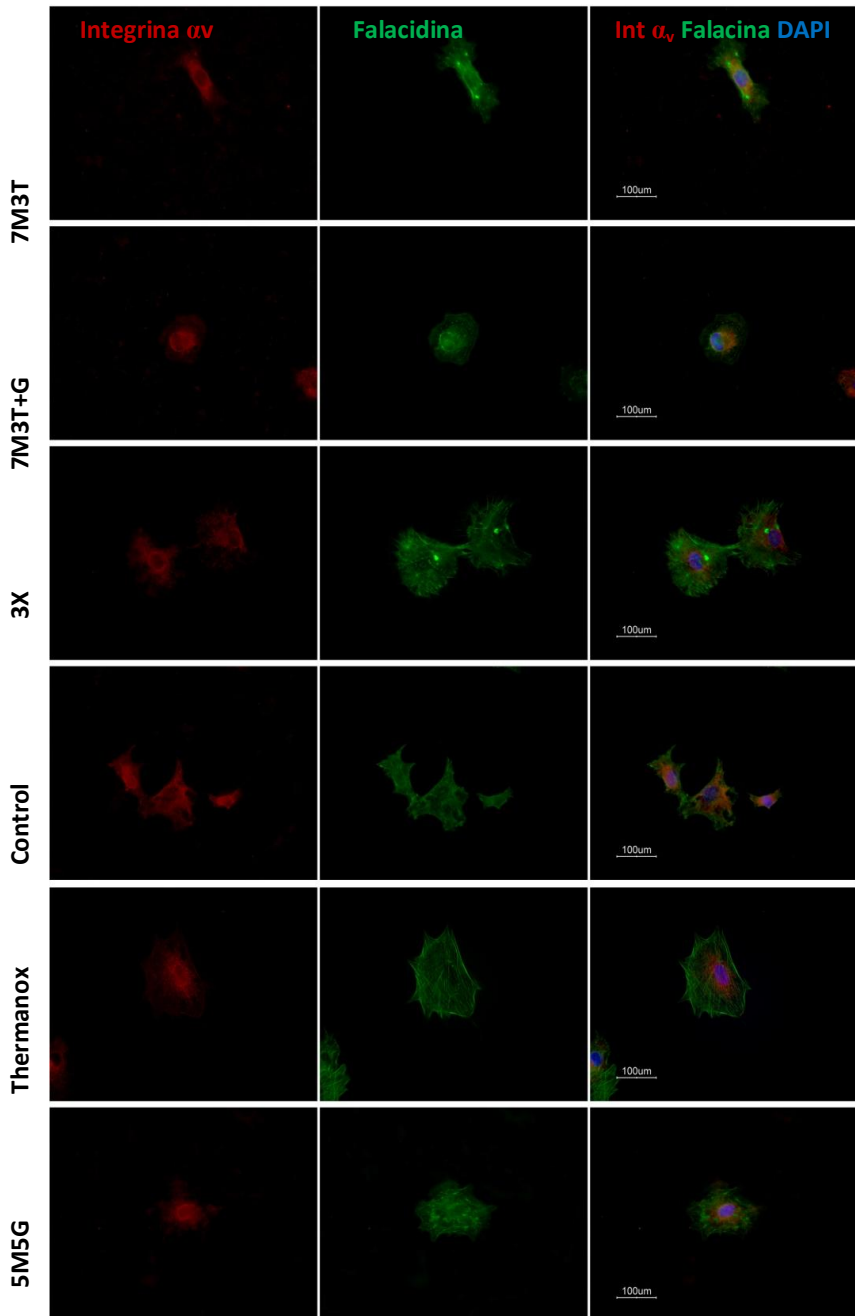


Figura 101. Inmunocitoquímica de integrinas a 3 horas de cultivo con preosteoblastos sobre discos de titanio recubiertos con las formulaciones 7M3T, 7M3T+G, 3X y 5M5G, además de para el Control (titanio sin recubrir) y el Control + (Thermanox®); marcaje de integrina α_V (columna de la izquierda, rojo); marcaje de actina del citoesqueleto con falacidina (columna central, verde), marcaje de integrina α_V (rojo), citoesqueleto (verde) y núcleos con DAPI (azul) (columna de la derecha).

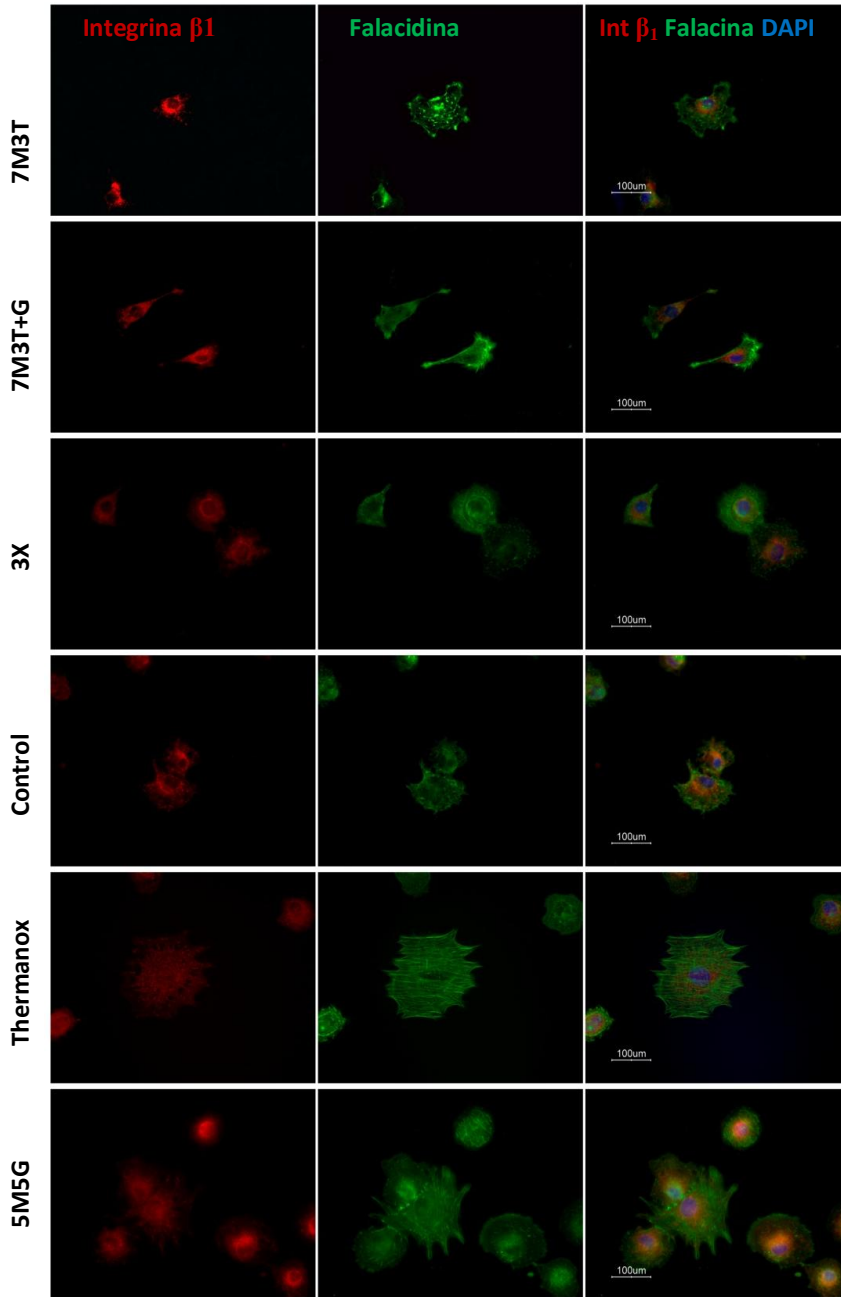


Figura 102. Inmunocitoquímica de integrinas a 3 horas de cultivo con preosteoblastos sobre discos de titanio recubiertos con las formulaciones 7M3T, 7M3T+G, 3X y 5M5G, además de para el Control (titanio sin recubrir) y el Control + (Thermanox®); marcaje de integrina β_1 (columna de la izquierda, rojo); marcaje de actina del citoesqueleto con falacidina (columna central, verde), marcaje de integrina β_1 (rojo), citoesqueleto (verde) y núcleos con DAPI (azul) (columna de la derecha).

Todos los sustratos indujeron la misma expresión del gen Fak, partiendo todos ellos de la misma cantidad de proteína para ser activada (Figura 103). Sin embargo, no se pudo cuantificar su forma fosforilada.

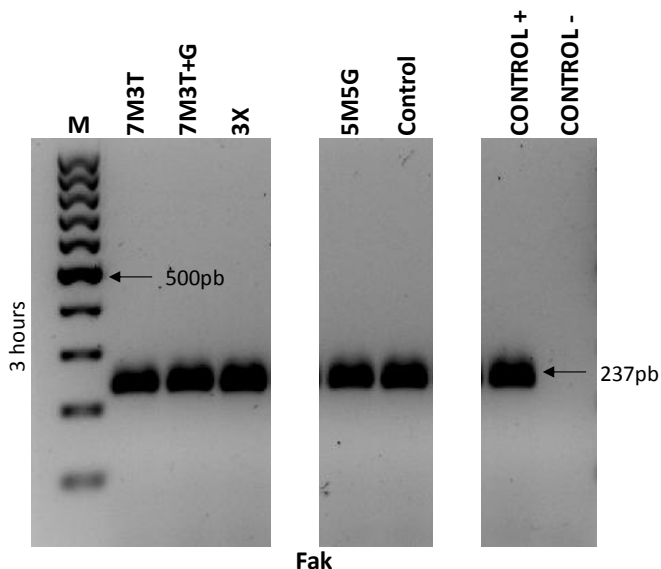


Figura 103. Gel de agarosa para la expresión de Fak a 3 horas

En el ensayo de adhesión mediante cuantificación de ADN, los valores para el Control y el recubrimiento 7M3T+G fueron mayores, siendo también mayores para 5M5G en la primera fase. Mediante el estudio de la morfología celular por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo, se observó menor tamaño celular sobre 7M3T+G, mostrando escasos anclajes al sustrato. La morfología de los osteoblastos sobre el Control y 3X fue más estrellada que el resto, observándose mayores puntos de anclaje al sustrato. Estos hallazgos, provenientes del ensayo de adhesión y del estudio de la morfología de preosteoblastos, pudieron ser corroborados mediante el marcaje de las proteínas de adhesión y las integrinas.

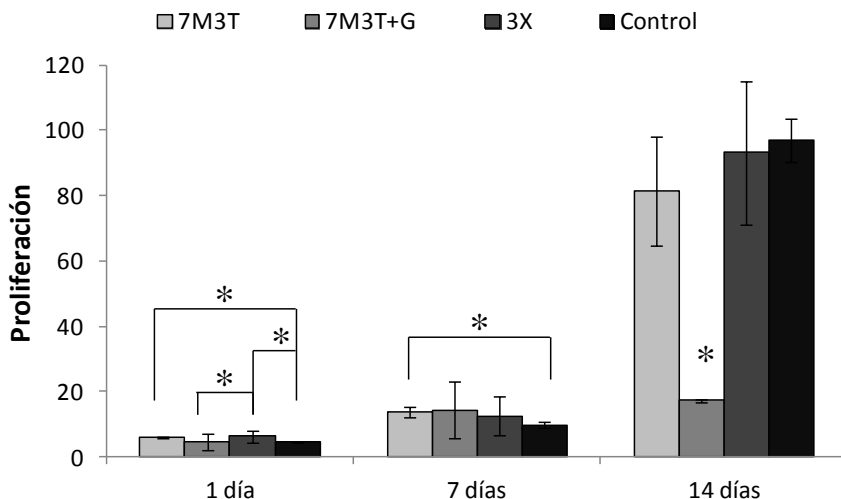
Al intentar correlacionar los datos de la caracterización físico-química con los valores de adhesión, observamos que el factor que mayor peso tiene en la adhesión de los preosteoblastos, en este caso, es la degradación. Los recubrimientos con menor tasa de degradación (3X y 5M5G) proporcionan una superficie más estable para la adhesión celular [2], así como las superficies estables del titanio y el Thermanox®.

3.1.3. Proliferación

Para determinar la proliferación de preosteoblastos inducida por cada uno de los materiales se realizó una cuantificación de ADN de cultivos a 1, 7 y 14 días.

En la Gráfica 29 se muestran los datos procedentes de este ensayo de proliferación de preosteoblastos sobre los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X, mediante cuantificación de ADN de cultivos de 1, 7 y 14 días.

Para un día de incubación se observaron datos de proliferación que, aunque a primera vista parecieron similares, fueron significativamente diferentes para el Control y 7M3T ($p = 0,000$), para el Control y el 3X ($p = 0,001$) y entre 7M3T+G y 3X ($p = 0,046$). A siete días de cultivo tan sólo se encontraron diferencias entre el Control y 7M3T ($p = 0,000$). Tras 14 días de cultivo tan sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el recubrimiento funcionalizado con gelatina ($p = 0,000$ con todos los recubrimientos y el Control), cuyos valores de proliferación no aumentaron como lo hicieran para los demás materiales ($p = 0,000$ para 7M3T, 3X y Control entre 1-7 días, 7-14 días y 1-14 días), manteniendo valores sin diferencias a los inducidos para 7 días.



Gráfica 29. Ensayo de proliferación de preosteoblastos sobre los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X, mediante cuantificación de ADN de cultivos de 1, 7 y 14 días.

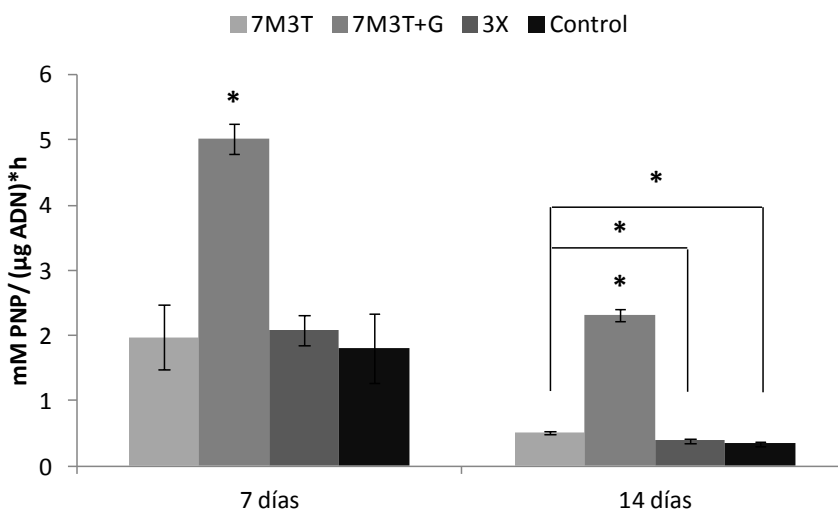
Mientras que las formulaciones sin gelatina indujeron la proliferación de osteoblastos con el tiempo, la formulación funcionalizada con gelatina mantuvo los mismos valores tras una y dos semanas de cultivo. Todos los materiales, excepto 7M3T+G, que presentó los mismos valores que a 7 días, indujeron, por igual, una alta proliferación de osteoblastos al finalizar el ensayo.

3.1.4. Diferenciación

La capacidad de los recubrimientos para inducir la diferenciación osteoblástica fue determinada por la cuantificación de la tasa de mineralización, obtenida como la fracción entre la actividad de la alcalina fosfatasa y el valor de ADN en el cultivo. La alcalina fosfatasa (ALP) es un indicador de diferenciación osteoblástico y su actividad es crucial para el inicio de la mineralización de la matriz extracelular.

En la Gráfica 30 se representan los valores de diferenciación para el Control y los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X, expresados como mM PNP/($\mu\text{g ADN}\cdot\text{h}$). No se observaron diferencias entre los recubrimientos sin gelatina y el Control, ni para una semana ni para dos semanas de ensayo.

Los mayores valores, para ambos periodos de estudio, fueron para 7M3T+G, siendo sus valores estadísticamente diferentes al resto de materiales ($p = 0,000$ para ambos materiales entre el 7M3T+G y el resto de materiales). Tras 14 días de ensayo los valores de diferenciación menores fueron para el Control (Control-7M3T $p = 0,004$), y para 3X (3X-7M3T $p = 0,021$), entre los que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, detrás de ellos, el 7M3T.



Gráfica 30. Ensayo de diferenciación mediante cuantificación de la actividad de ALP de los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X y el Control, en relación a la población celular.

Los bajos valores de diferenciación inducidos por 7M3T+G se debieron a que este recubrimiento indujo una mayor y más temprana diferenciación osteoblástica. En los demás casos, la población celular continuó proliferando durante los 14 días de ensayo, por lo que la actividad de ALP para los recubrimientos 7M3T, 3X y el Control fue menor ya que también lo fue la diferenciación.

Los valores de diferenciación del ensayo de actividad de ALP fueron mayores para el recubrimiento 7M3T+G, tanto para una semana como para dos. Sin embargo, se demostró que hubo diferenciación osteoblástica en todos los sustratos.

Se evaluó la presencia de otras proteínas de diferenciación de osteoblastos como BSP y OCN, marcadores tardíos de diferenciación osteoblástica, y del factor de transcripción RUNX2, indicador del comienzo del proceso de diferenciación en etapas preosteoblásticas. Para ello, se realizó un ensayo inmunocitoquímico para BSP y OCN tras 14 días de incubación con medio de diferenciación osteogénico y otro para RUNX2 tras 3 horas de cultivo con medio de diferenciación osteogénico. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 104. El marcaje en todos los sustratos tuvo lugar de manera muy similar, excepto para el Control en el que las imágenes para todas ellas mostraron un marcaje más homogéneo y difuminado debido, es posible, a una significativamente mayor población celular.

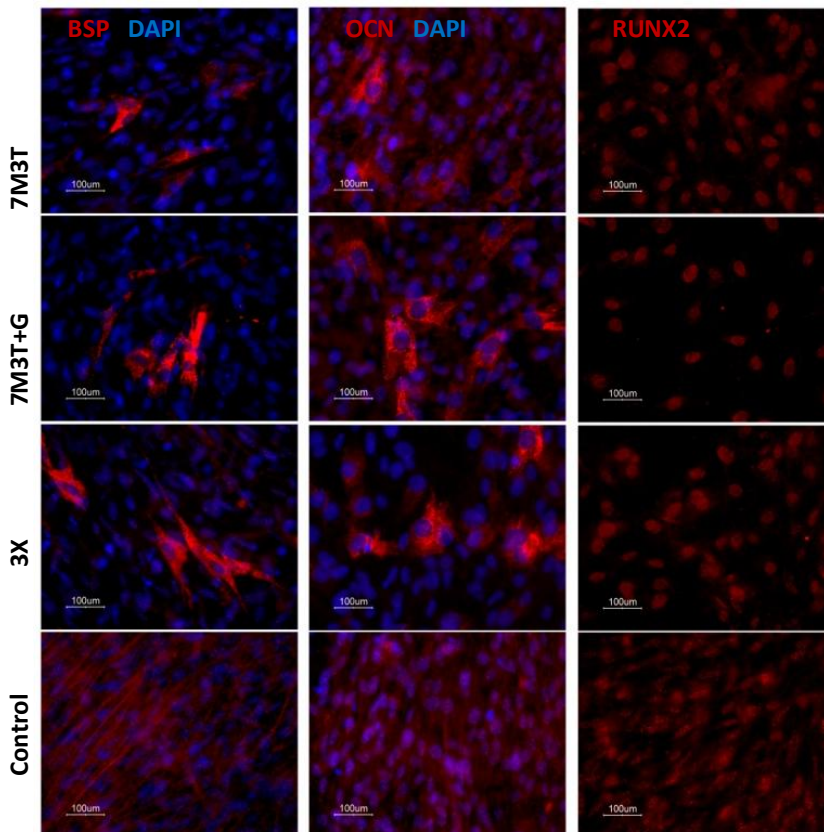


Figura 104. Inmunocitoquímica para las proteínas BSP y OCN tras 14 días de cultivo de MC3T3-E1 con medio de diferenciación osteogénico (columnas izquierda y centro, respectivamente) y para el factor de transcripción RUNX2 tras 3 horas de cultivo de preosteoblastos con medio de diferenciación osteogénico (derecha).

Como ensayo complementario, se decidió realizar un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para determinar la expresión génica de los mismos genes que codifican para las proteínas evaluadas mediante inmunocitoquímica. Así pues se realizó un ensayo de RT-PCR para los genes Ocn y Bsp tras 4 y 14 días de cultivo de MC3T3-E1 con medio de diferenciación osteogénico, para comprobar que la población obtenida era una población de osteoblastos maduros. Del mismo modo se determinó también la expresión para Runx2 tras varios periodos cultivo (3 horas, 4 días, 7 días y 14 días), para corroborar que la población celular iba diferenciando con el tiempo y por tanto reduciendo la expresión de Runx2, puesto que está implicado en la diferenciación temprana del linaje osteoblástico.

La Figura 105 muestra los datos de expresión génica para Ocn y Bsp tras 4 y 14 días de cultivo en medio de diferenciación. Los resultados de RT-PCR mostraron una mayor expresión para ambas proteínas tras 14 días de cultivo, sin observar diferencias entre los sustratos.

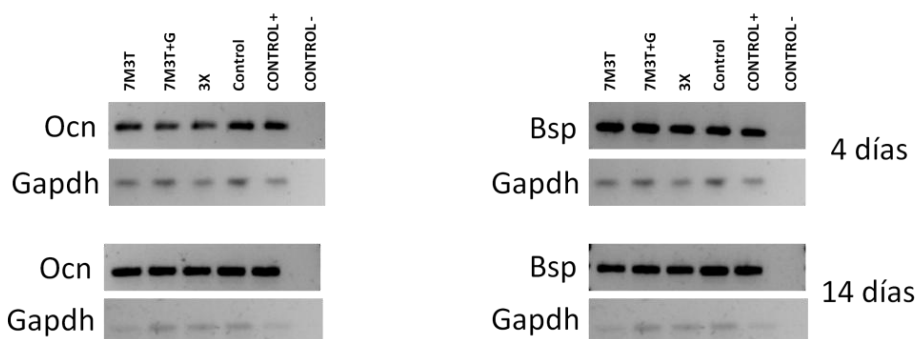


Figura 105. Gel de agarosa para la expresión de Ocn y Bsp, junto al gen constitutivo Gapdh, a 4 Días (arriba) y a 14 días (abajo).

Estos resultados indicaron que la población celular obtenida era una población de osteoblastos diferenciados [251], produciéndose diferenciación osteoblástica en todos los sustratos.

En la Figura 106 se muestran los resultados de RT-PCR para la expresión de Runx2. Se pudo observar una mayor expresión inicial para el recubrimiento 3X, el titanio (Control) y el Thermanox® (Control +) y cómo, según disminuía ésta con el tiempo, aumentaba para los recubrimientos 7M3T y 7M3T+G.

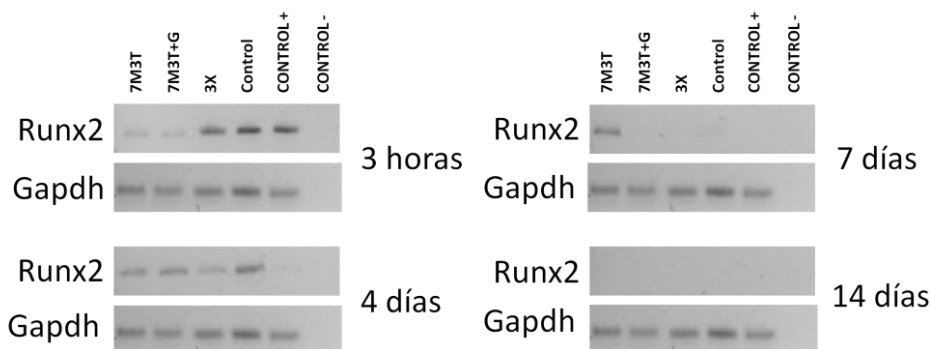


Figura 106. Gel de agarosa para la expresión de Runx2, junto al gen constitutivo Gapdh, a 3 horas (arriba izquierda), a 4 días (abajo izquierda), a 7 días (arriba derecha) y a 14 días (abajo izquierda).

Según la expresión temprana de Runx2, parece que el Control, el Control + y el recubrimiento 3X tiendan a una diferenciación de la población preosteoblástica más temprana.

Apuntar que, en relación a la bioactividad de los recubrimientos, en los cultivos *in vitro* a 14 días no se observó nucleación de hidroxiapatita, pese a que en el medio de cultivo encontramos los mismos compuestos a concentraciones similares al líquido corporal simulado empleado en los ensayos *in vitro* de bioactividad (27-Tris-SBF), como se puede ver en la Tabla 21.

	DEMEm (mg/ml)	27-Tris-SBF (mg/ml)
NaCl	6.545,0	6.400,0
KCl	400,0	373,0
NaHCO ₃	3.700,0	2.268,2
CaCl ₂ -2H ₂ O	264,0	367,5
NaH ₂ PO ₄	141,0	141,9
pH	7,4	7,4

Tabla 21. Comparativa de las composiciones del medio de cultivo, empleado en los ensayos celulares (DMEM-*low glucose*), y el fluido corporal simulado empleado para el ensayo de bioactividad de los materiales (27-Tris-SBF).

Este hecho hace pensar en que otros factores, además de la disponibilidad de iones y la topografía [225], afectan a la nucleación de la apatita, como el volumen de solución empleado, la superficie en contacto con la solución o el carácter dinámico o estático del ensayo. En el modelo de ensayo de bioactividad no se considera el control del contenido de carbonato en la solución de líquido corporal simulado (SBF), a pesar

de que el suero sanguíneo está en equilibrio con una presión parcial de CO₂ cercana a 0,05 atm, que es al factor clave para el tamponado del pH del suero sanguíneo [252]. Los fluidos biológicos están supersaturados de iones, pero la deposición y crecimiento de cristales están estrictamente regulados por las proteínas del suero [19].

Llegados hasta este punto, podemos resumir los resultados obtenidos. El recubrimiento 7M3T+G fue el que más redujo la topografía granallada del titanio. Todos los recubrimientos presentaron un carácter hidrófilo superior al titanio. Ninguno de los recubrimientos indujo toxicidad celular. De entre los recubrimientos, fue 7M3T+G el que indujo la adhesión de un mayor número de células, sin embargo tanto el Control como el recubrimiento 3X mostraron una mayor calidad de dicha adhesión al sustrato, observándose mayor señal para las proteínas de adhesión e integrinas, así como una mejor organización del citoplasma con formación de lamelipodios, filopodios y mayores adhesiones focales. Se comprobó que todos los recubrimientos y el Control indujeron diferenciación osteoblástica al cabo de 14 días. El recubrimiento 7M3T+G mostró una mayor y más rápida actividad de ALP, dando a entender una diferenciación más temprana, aunque los datos de expresión de Runx2 otorgan esta cualidad al recubrimiento 3X y al Control. RUNX2 es un factor de transcripción esencial pero insuficiente para completar, *in vitro*, la diferenciación del linaje osteoblástico y la mineralización de la matriz. RUNX2 interacciona con factores adicionales u otras vías transcripcionales específicas de osteoblastos mediante cascadas de diferenciación; como el correpresor TLE, el factor de transcripción HES-1, los cofactores c-fos y c-jun del complejo AP-1, el potenciador de unión a proteínas CCAAT, sin olvidarnos del factor de transcripción específico de osteoblastos Osterix (Osx), entre otros. El proceso de diferenciación osteoblástico es muy complejo [253] y falta mucho por elucidar sobre las intrincadas rutas de señalización que orquestan el desarrollo de los tejidos mineralizados y sus interacciones [254].

3.2. Evaluación biológica tras la implantación *in vivo*

El efecto de los recubrimientos sobre los tejidos vivos, fue evaluado mediante un estudio experimental *in vivo* de implantación en tibia de conejo, denominada **Fase de Caracterización II**. Las muestras obtenidas tras la implantación fueron procesadas para obtener cortes histológicos que poder observar al microscopio óptico y así evaluar los efectos locales tras la implantación, como la respuesta de reacción a cuerpo extraño y la capacidad de osteointegración de los diferentes recubrimientos respecto del Control, así como la degradación *in vivo* de las distintas formulaciones.

En la **Fase de Caracterización II** tan sólo una prótesis radicular fue implantada por tibia, intentando que todas tuvieran la misma localización en la tibia y pretendiendo que la parte apical apoyara en la cortical opuesta para favorecer la estabilidad primaria, como se puede observar en la Figura 107. Este hecho implicó un cambio en modelo animal empleado en la primera implantación ya que, mientras que en la primera implantación no se proporcionó la suficiente de estabilidad primaria, en la segunda se tuvieron en cuenta diversos aspectos para favorecerla, además de para estandarizar los lugares de implantación. En esta ocasión, los periodos de ensayo se redujeron a 1 y 2 semanas puesto que las mayores diferencias observadas entre los materiales en la **Fase de Caracterización II** fueron observadas a tiempos cortos.

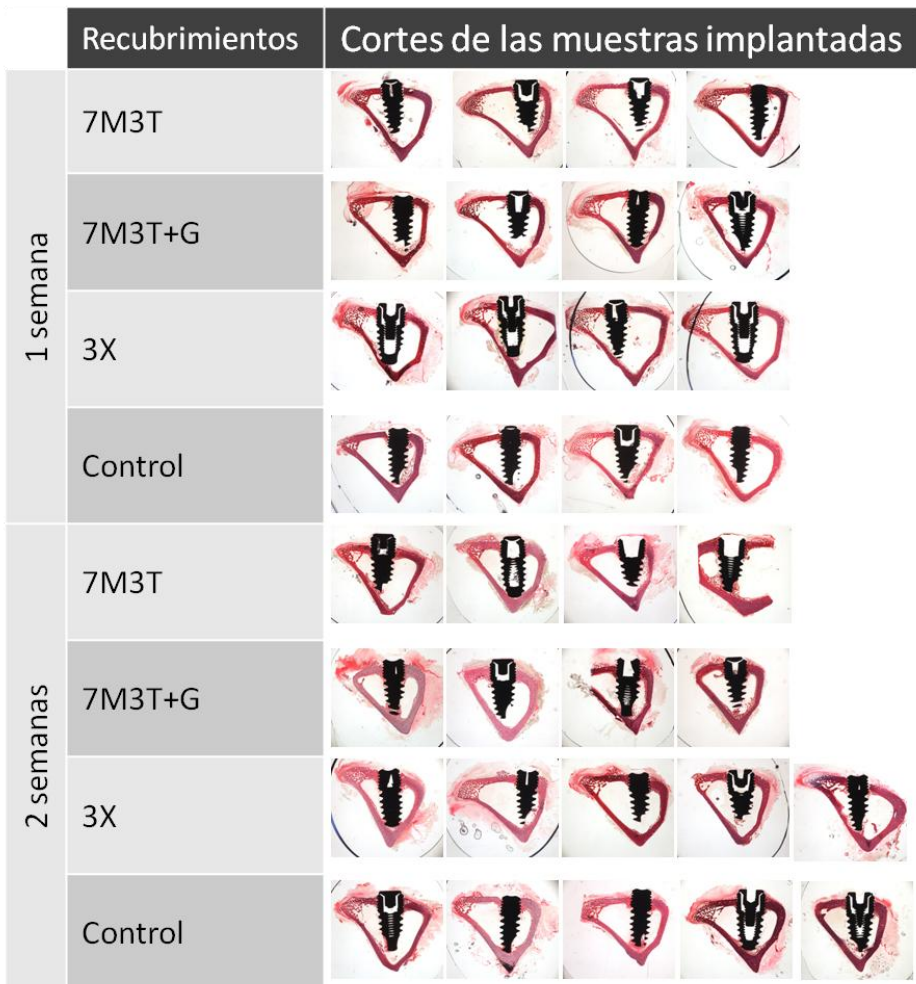


Figura 107. Cortes histológicos de las muestras implantadas (7M3T, 7M3T+G, 3X y Control) en tibia de conejo para cada uno de los periodos de estudio (1 y 2 semanas) en la **Fase de Caracterización II**.

3.2.1. Evaluación de la respuesta de reacción a cuerpo extraño

Según norma (ISO 10993-6), los efectos locales tras la implantación deben ser evaluados durante el proceso de desarrollo de un biomaterial para aplicación ortopédica. Así pues, es esencial el estudio del grado de biocompatibilidad *in vivo* del sistema implante-huésped de los nuevos recubrimientos desarrollados, comprobando que no induzcan una reacción adversa sobre los tejidos. Para ello se realizó un estudio semicuantitativo basado en un sistema de puntuación, de hasta 3 puntos, a una serie de ítems relacionados con los efectos de los materiales sobre los tejidos circundantes a los implantes, tras la observación de los cortes histológicos con microscopio óptico.

De esta observación microscópica, se extrajo un estudio cualitativo de los principales eventos indicativos de la biocompatibilidad del sistema, tomando fotografías representativas de cada uno de los eventos mencionados para cada material y cada periodo de ensayo.

3.2.1.1. Estudio cualitativo de la respuesta de reacción a cuerpo extraño

Los principales eventos histológicos estudiados en este estudio cualitativo de la biocompatibilidad de los recubrimientos fueron: el estado de la médula ósea, la presencia de células gigantes de reacción a cuerpo extraño y la formación y evolución de la cápsula fibrosa.

Médula

Para el material 7M3T, la médula se encontró no demasiado traumatizada, sobre todo en zonas alejadas del implante donde hubo poco impacto. Sin embargo, el estado general de la médula empeoró en la segunda semana (Figura 108). Estas observaciones coinciden con las de la primera implantación.

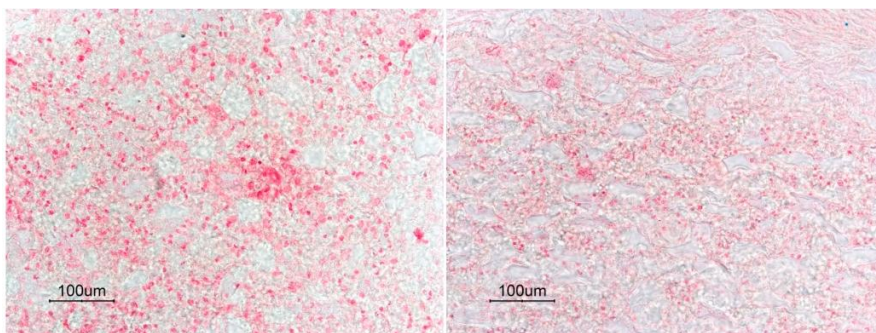


Figura 108. Estado de la médula ósea en el recubrimiento 7M3T; con aspecto poco traumatizado tras 1 semana de implantación (izquierda); médula con pérdida adipocítica, acompañada de pérdida de arquitectura tras 2 semanas de implantación (derecha).

El material 7M3T+G mostró una médula muy traumatizada tanto a una como a dos semanas, con una alta proporción de adipocitos que perdieron su estructura y gran ausencia celular en el tejido medular (Figura 109).

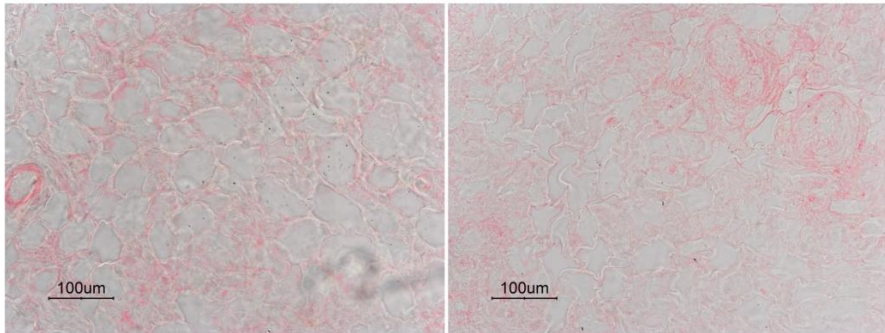


Figura 109. Estado de la médula ósea en el recubrimiento 7M3T+G; con un aspecto muy traumatizado tanto tras 1 semana de implantación (izquierda) como tras 2 semanas de implantación (derecha), mostrando una médula totalmente aplásica con abundancia de adipocitos, cuya arquitectura se encontró totalmente alterada.

El mismo nivel de traumatismo encontrado en 7M3T+G, se encontró para ambos periodos de estudio de la formulación 3X. Sin embargo, aquí encontramos una baja proporción de grasa y una excesiva carga celular generalizada sin preservación de la arquitectura del tejido (Figura 110).

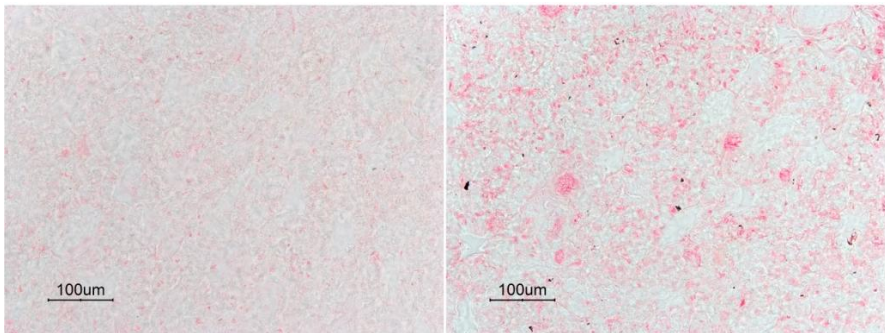


Figura 110. Estado de la médula ósea en el recubrimiento 3X; con un aspecto muy traumatizado tanto tras 1 semana de implantación (izquierda) como tras 2 semanas de implantación (derecha), mostrando una médula con pérdida de la carga adipocítica y de su arquitectura.

El Control mostró en la primera semana una gran aplasia medular en las zonas en contacto con el implante, que fue recuperándose ligeramente a las dos semanas, restableciendo su arquitectura y carga celular (Figura 111). En la primera implantación también sucedió que el Control presentaba una médula más traumatizada que 7M3T, alcanzando ambos el mismo nivel a 4 semanas.

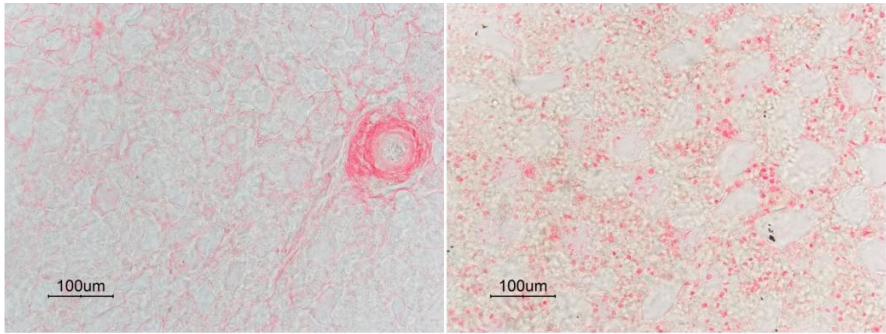


Figura 111. Estado de la médula ósea en el Control; mostrando una aplasia total tras 1 semana de implantación (izquierda); recuperando la carga celular y la arquitectura tras 2 semanas (derecha).

Células gigantes de reacción a cuerpo extraño

En 7M3T y en el Control se observaron algunas células de reacción a cuerpo extraño tanto a una como a dos semanas, coincidiendo con lo observado en la primera implantación (Figura 112), aunque también fueron encontradas de forma ocasional en otros materiales. Sin embargo, en ningún caso la presencia de estas células excedió al patrón fisiológico de respuesta a cuerpo extraño de todo organismo ante cualquier implantación.

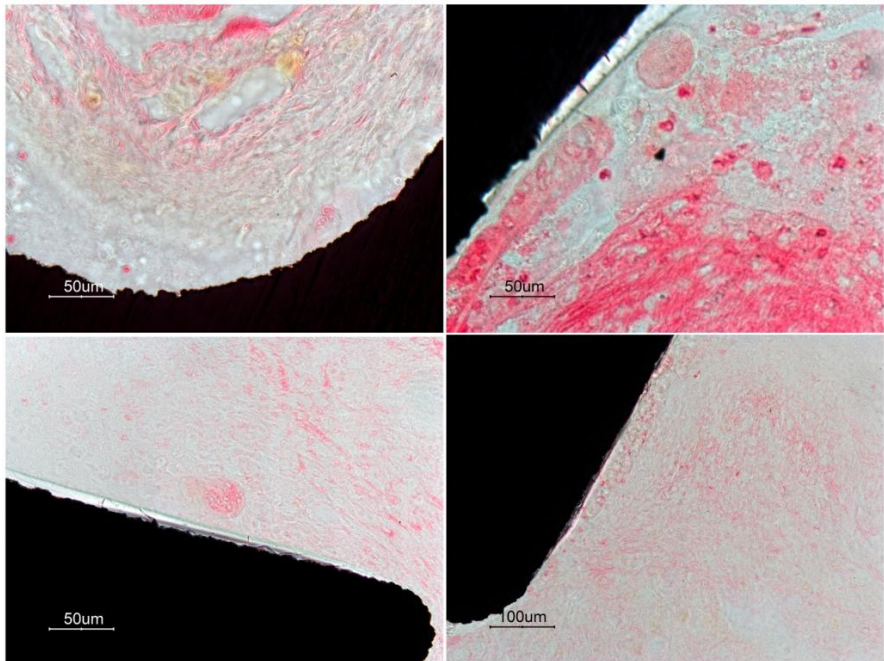


Figura 112. Células gigantes de reacción a cuerpo extraño encontradas en el Control a 8 semanas (arriba) y en el recubrimiento 7M3T tras 2 semanas de implantación (abajo).

Cápsula fibrosa

A continuación, se muestran imágenes, tomadas con un aumento a 10X, de las cápsulas fibrosas que se produjeron como reacción tras la implantación durante una y dos semanas de cada material.

Para el recubrimiento 7M3T, se encontró una banda fibrosa laxa y ancha que se densificó ligeramente tras dos semanas de implantación mostrándose algo más fina. Esta cápsula fibrosa fue hallada alrededor del implante en las zonas en contacto con el espacio medular. No se encontró tejido fibroso entre el hueso y el implante (Figura 113).

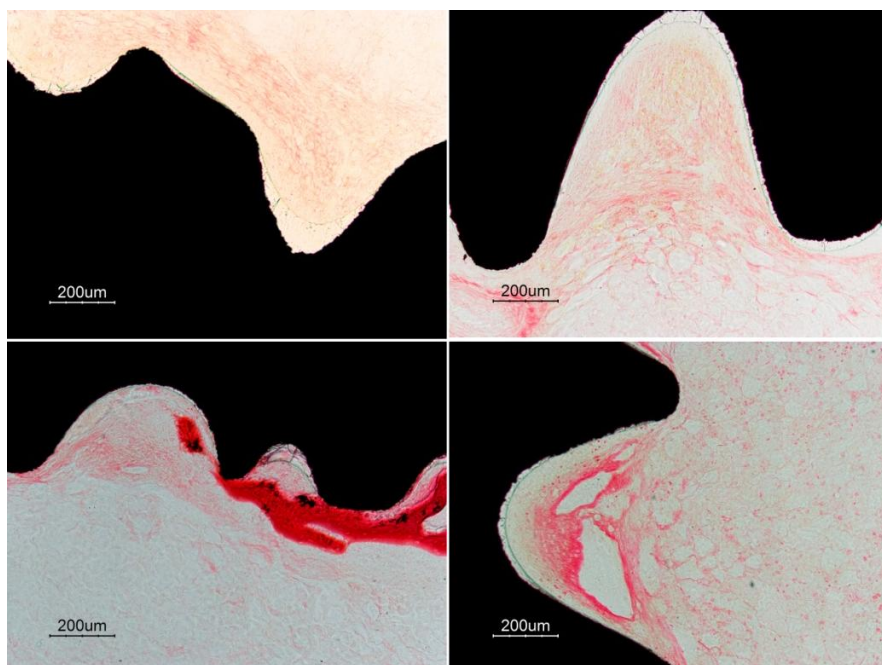


Figura 113. Evolución de la cápsula fibrosa para el recubrimiento 7M3T; banda fibrosa extensa y laxa tras 1 semana de implantación (arriba); tras 2 semanas de implantación la banda fibrosa se va compactando (abajo) haciéndose más fina.

Para el recubrimiento 7M3T+G también se encontró una banda fibrosa laxa y ancha en contacto con el espacio medular. Tras dos semanas de implantación, la cápsula fibrosa se densificó ligeramente perdiendo algo de espesor (Figura 114). La evolución de la cápsula fibrosa formada alrededor del recubrimiento 3X no fue distinta a la del resto de recubrimientos. En esta ocasión, también se encontró una banda fibrosa ancha y extensa que con el tiempo fue haciéndose un poco más densa (Figura 115).

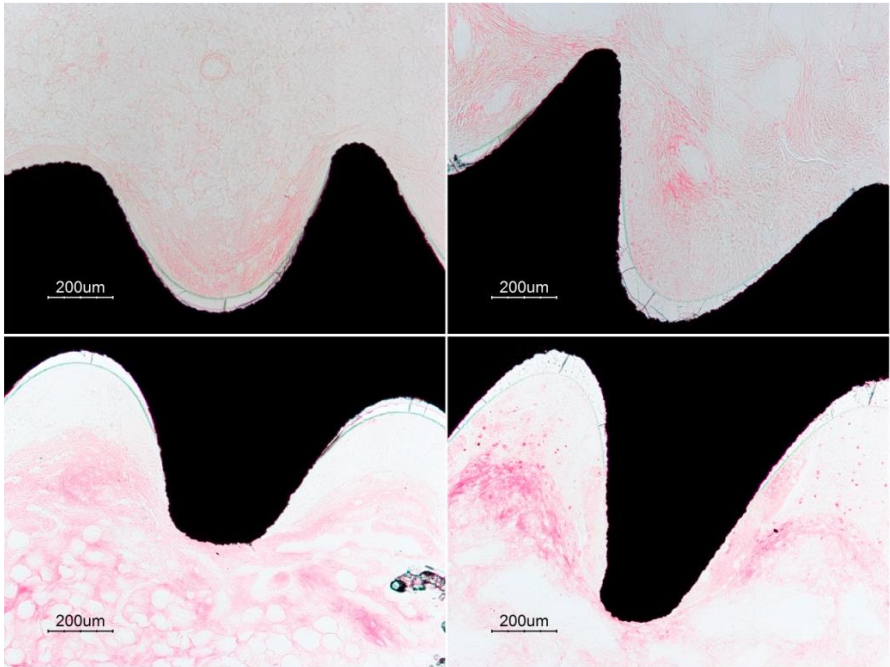


Figura 114. Evolución de la cápsula fibrosa para el recubrimiento 7M3T+G; banda fibrosa laxa y gruesa tras 1 semana de implantación (arriba); tras 2 semanas de implantación la médula se va densificando (abajo), perdiendo algo de espesor.

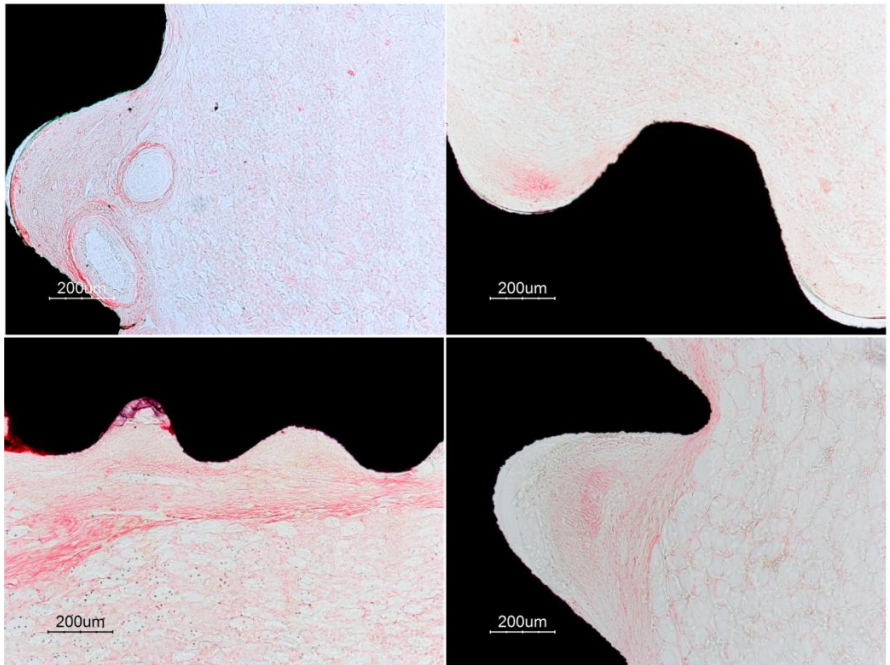


Figura 115. Evolución de la cápsula fibrosa para el recubrimiento 3X; banda fibrosa extensa y laxa tras 1 semana de implantación (arriba); tras 2 semanas de implantación la médula comenzó a hacerse un poco más densa, aunque sin alterar mucho su espesor (abajo).

Para las muestras Control, se encontraron bandas fibrosas con las mismas características que las encontradas para los recubrimientos. Aquí la evolución de estas cápsulas, tras dos semanas de implantación, fue idéntica a la evolución de las demás cápsulas encontradas para los recubrimientos, es decir, densificación y pérdida de espesor (Figura 116).

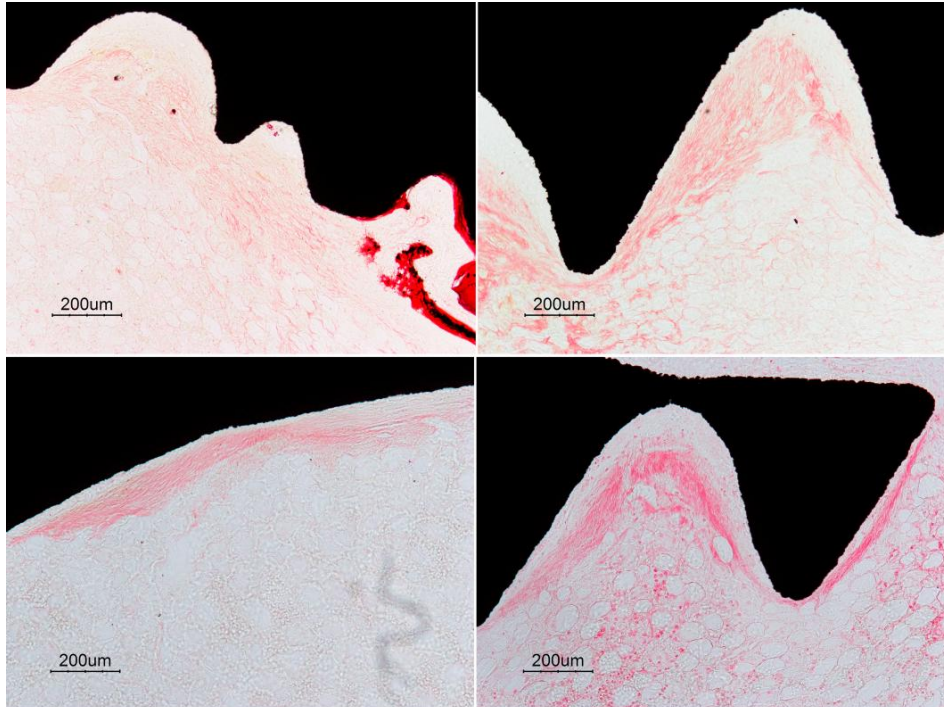


Figura 116. Evolución de la cápsula fibrosa para el Control; banda fibrosa extensa y laxa tras 1 semana de implantación (arriba); tras 2 semanas de implantación la médula se va densificando (abajo), perdiendo espesor.

Así pues, para todos los materiales se observó la misma tendencia general en la formación y evolución de la cápsula fibrosa. Tras una semana de implantación, las bandas fibrosas encontradas eran gruesas y laxas, densificándose con el tiempo y mostrando unas bandas más finas a dos semanas. Cabe esperar que, como sucediera para 7M3T y el Control en la **Fase de Caracterización I** tras 4 y 8 semanas de implantación, estas cápsulas fibrosas continuaran densificándose con el tiempo hasta formar, a 8 semanas, una fina banda fibrosa alrededor del implante en contacto con la médula ósea. En esta **Fase de Caracterización II**, se encontró cápsula fibrosa en los lugares donde no había contacto con hueso, es decir, en el espacio medular. No fue frecuente encontrar la banda fibrosa interpuesta entre el implante y la cortical

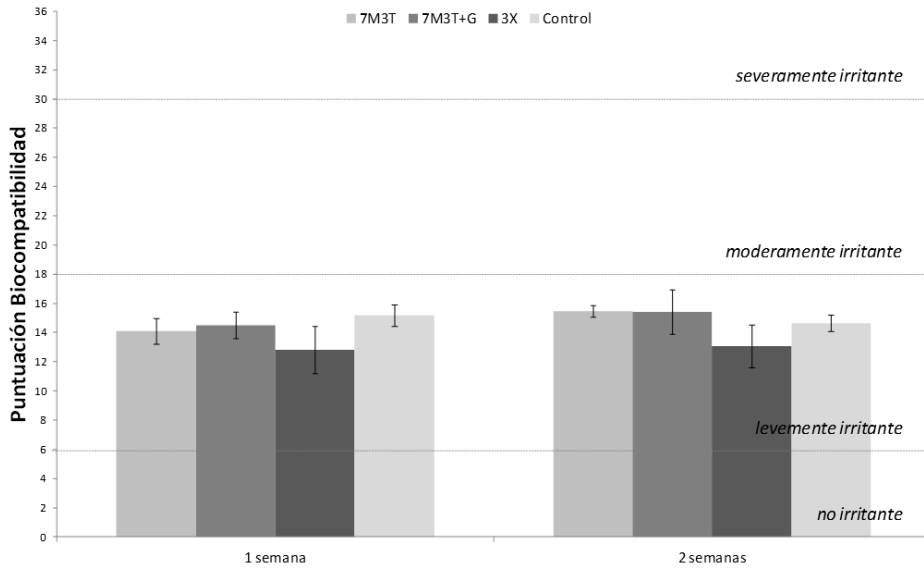
encontrada en la mayoría de muestras de la primera implantación, ni entre el implante y el hueso trabecular encontrada en los recubrimientos 5V5G y 5M5G de la primera implantación. Una posible razón podría ser que en esta implantación se procuró que todos los implantes apoyaran su extremo apical en la cortical opuesta, consiguiéndolo en un gran número de muestras. Esta implantación otorgaría una mayor estabilidad primaria al implante, reduciendo el exceso de micromovimientos y por tanto la formación de la cápsula fibrosa en esta zona intermedia.

Por tanto, en esta segunda implantación no encontramos más diferencias entre materiales que las encontradas entre muestras del mismo material.

3.2.1.2. Estudio semicuantitativo de la respuesta de reacción a cuerpo extraño

Para el estudio semicuantitativo de la respuesta de reacción a cuerpo extraño, se obtuvo una clasificación de los materiales según su puntuación obtenida para 12 ítems relativos al carácter biocompatible del sistema implante-huésped con los recubrimientos seleccionados: aplasia medular (1), pérdida de la arquitectura medular (2), estado medular en zonas alejadas del implante (3), ratio de adipocitos medulares (4), necrosis del hueso cortical (5), necrosis del hueso trabecular (6), presencia de células gigantes de reacción a cuerpo extraño (7), presencia de fibrosis/cápsula fibrosa en contacto con la médula (8), presencia de fibrosis/cápsula fibrosa entre la cortical y el implante, entre el hueso trabecular y el implante (10), grado de densificación de la cápsula fibrosa (11) y neovascularización (12).

La Gráfica 31 muestra la puntuación conseguida, en cada periodo de implantación, para cada recubrimiento y el Control. El análisis de los ítems de biocompatibilidad mostró valores muy similares para los recubrimientos y el Control, siendo todos ellos clasificados como levemente irritantes. El resultado estadístico demostró que no había diferencias entre los efectos locales tras la implantación inducidos por los recubrimientos y el titanio. Pese a las diferencias que se pudieron observar en el estudio cualitativo previo, el estudio estadístico demostró que la adición de los recubrimientos a los implantes de titanio no modifica su comportamiento con los tejidos vivos.



Gráfica 31. Representación de los datos obtenidos de la puntuación de los ítems de biocompatibilidad semicuantitativa de 7M3T, 7M3T+G, 3X y Control.

3.2.2. Evaluación de la osteointegración

Con el objetivo de evaluar la capacidad de osteointegración de los implantes recubiertos y el Control, se observaron mediante microscopio óptico los cortes histológicos obtenidos en la segunda fase de experimentación animal.

Para alcanzar este objetivo, se realizaron varios tipos de estudio: un **Estudio histológico** previo, en el que fueron observados determinados parámetros indicativos de osteointegración de forma cualitativa, y dos estudios histomorfométricos, en los que se cuantificaron algunos de esos parámetros (**Histomorfometría panorámica** e **Histomorfometría detallada**).

En esta **Fase de Caracterización II** los implantes con recubrimiento 7M3T y los implantes Control alcanzaron una osteointegración muy similar tanto a 1 como a 2 semanas de implantación (Figura 117). Transcurridas 2 semanas de la implantación, el recubrimiento 7M3T+G pareció mostrar cualitativamente un mayor nivel de osteointegración para sus implantes (Figura 118).

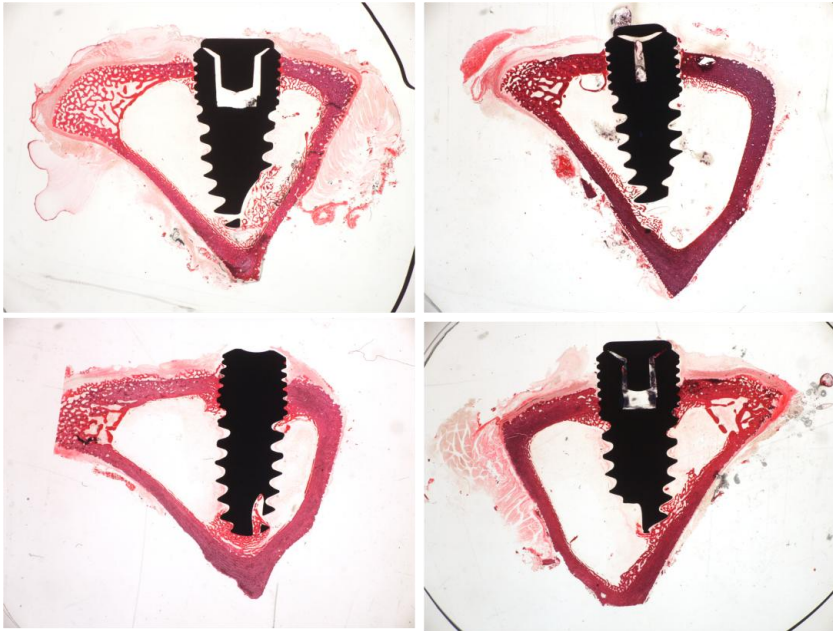


Figura 117. Imágenes panorámicas de las muestras implantadas; Control tras 1 semana de implantación (arriba izquierda); recubrimiento 7M3T tras 1 semana (arriba derecha); Control tras 2 semanas de implantación (abajo izquierda) y 7M3T tras 2 semanas de implantación (abajo derecha).

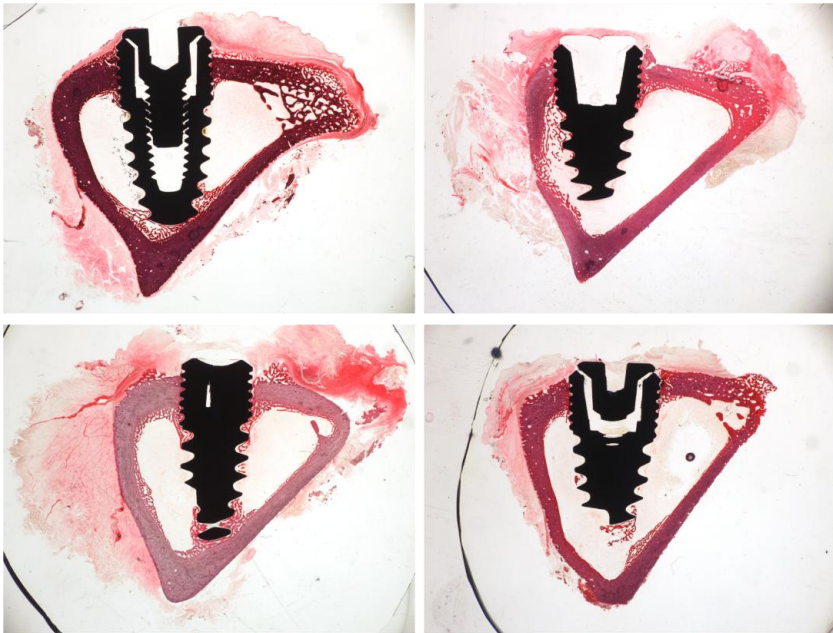


Figura 118. Imágenes panorámicas de las muestras implantadas durante 2 semanas: Control (arriba izquierda), recubrimiento 7M3T (arriba derecha), recubrimiento 5V5G (abajo izquierda) y recubrimiento 5M5G (abajo derecha).

3.2.2.1. Estudio histológico

En este estudio cualitativo de la osteointegración se tuvieron en cuenta diferentes parámetros como la osteointegración con la cortical, la osteointegración con el hueso trabecular y la activación osteoblástica.

Osteointegración de la cortical

La capacidad de osteointegración de un implante con el hueso cortical establece la premisa para que tenga lugar la neoformación de hueso trabecular alrededor del implante, otorgándole la estabilidad biológica a largo plazo (estabilidad secundaria).

Debido a los cambios en el modelo animal, en esta segunda implantación, se consiguió que la zona del implante diseñada para osteointegrar con el hueso cortical estuviera localizada en contacto con la cortical, principalmente, y no con el hueso trabecular o el espacio medular.

A continuación, se muestra el estado de las corticales encontradas para cada tipo de recubrimiento y el Control evaluados en la ***Fase de Caracterización II***, registrados mediante imágenes a 10X de microscopía óptica.

En el caso del recubrimiento 7M3T se observó que el hueso cortical ocupó los espacios en las roscas de los implantes destinados al hueso cortical, quedando en contacto con el recubrimiento puesto que no se encontró tejido fibroso intermedio que lo impidiera. El recubrimiento permaneció intacto tras dos semanas de implantación (Figura 119). La osteointegración de la cortical para este recubrimiento fue sin duda mejor que la osteointegración alcanzada por el mismo recubrimiento durante la primera fase experimental.

Para el recubrimiento 7M3T+G encontramos una cortical alojada en los valles de las roscas de la cabeza del implante, intentando regenerarse para ocupar el espacio libre hasta el recubrimiento, que no degradó pasadas dos semanas de la implantación (Figura 120). El nivel de osteointegración alcanzado para 7M3T+G pareció ser ligeramente superior al alcanzado por 7M3T tras 2 semanas.

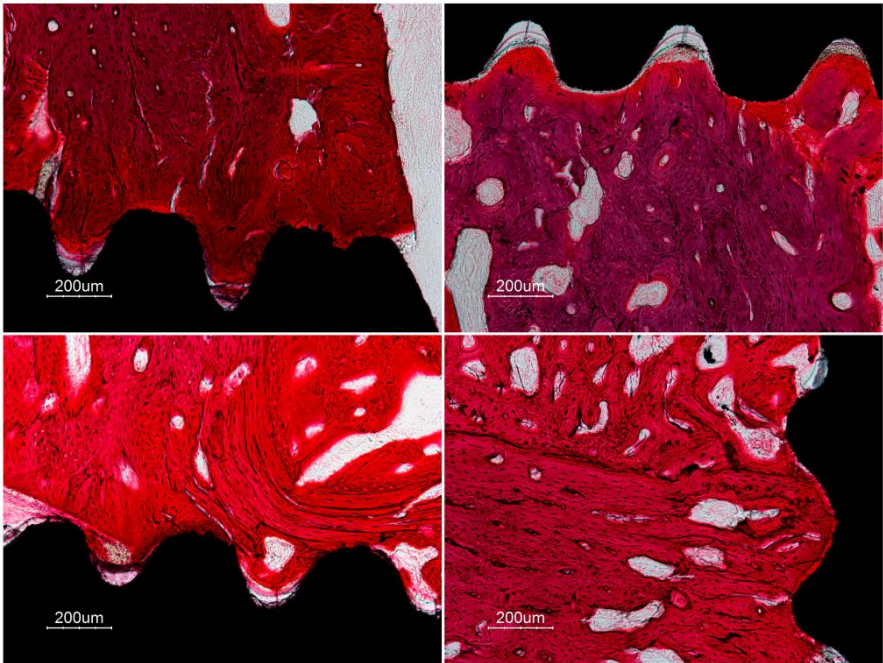


Figura 119. Osteointegración del hueso cortical para el recubrimiento 7M3T tras 1 semana de implantación (izquierda) y tras 2 semanas de implantación (derecha). Se observó cómo el hueso cortical ocupó el espacio disponible en los valles sin presencia de tejido fibroso interpuesto.

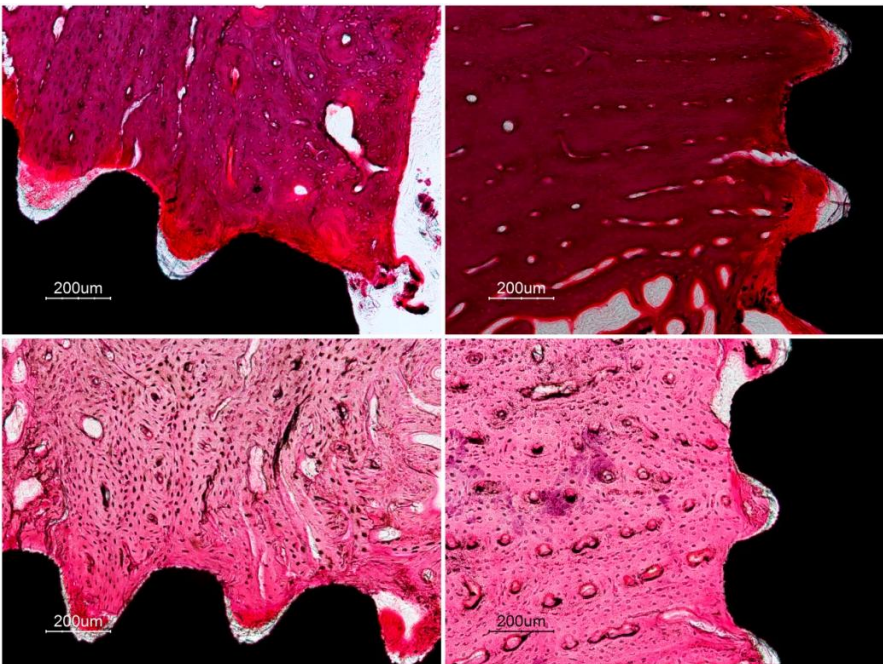


Figura 120. Osteointegración del hueso cortical para el recubrimiento 7M3T+G tras 1 semana de implantación (izquierda) y tras 2 semanas de implantación (derecha). El hueso

cortical ocupa el espacio disponible en los valles facilitándose el contacto del hueso cortical con el implante, debido a la ausencia de tejido fibroso interpuesto.

Para 3X, se observaron espesores algo mayores del recubrimiento en los valles de la cabeza del implante en contacto con el hueso cortical, por lo que el espacio disponible para la ocupación del hueso cortical fue menor. Sin embargo, el espacio disponible fue ocupado por el hueso cortical estableciendo contacto con el recubrimiento, debido a la ausencia de tejido fibroso intermedio (Figura 121). El grado de osteointegración del recubrimiento 3X pareció ser algo inferior que el alcanzado para los recubrimientos 7M3T puro y funcionalizado con gelatina.

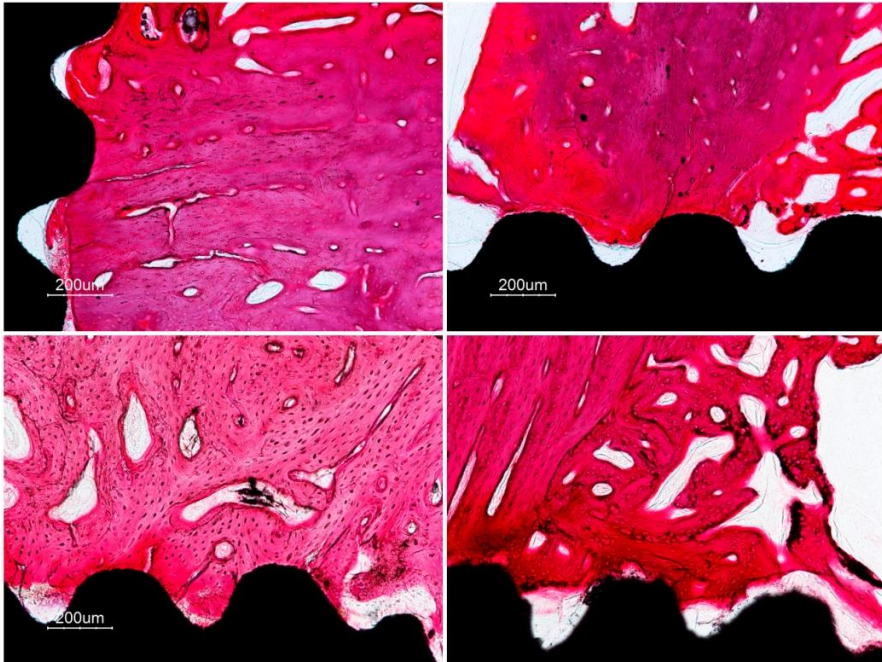


Figura 121. Osteointegración del hueso cortical para el recubrimiento 3X tras 1 semana de implantación (izquierda) y tras 2 semanas de implantación (derecha). Se observó, en ambos periodos de estudio, que el hueso cortical ocupaba el espacio disponible en los valles. No se encontró tejido fibroso interpuesto entre el hueso cortical y el recubrimiento.

En el caso del Control, al no existir recubrimiento que ocupara parte del espacio en los valles de las roscas destinadas al hueso cortical, en la mayor parte de los casos, éste ocupó todo el espacio de los valles. Tampoco aquí se encontró tejido fibroso intermedio entre el hueso y el implante que impidiera el contacto directo del hueso cortical, antiguo o neoformado, con el implante (Figura 122).

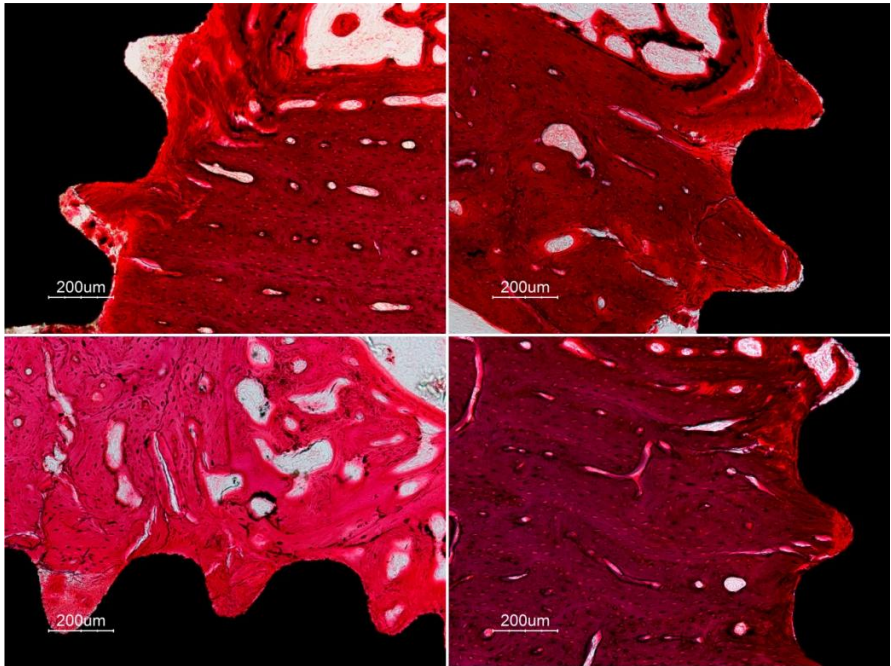


Figura 122. Osteointegración del hueso cortical para el Control tras 1 semana de implantación (izquierda) y tras 2 semanas de implantación (derecha). Ocupación total del hueso cortical en los valles de la cabeza de los implantes Control, consiguiendo un contacto hueso-implante directo, debido a la ausencia de tejido fibroso interpuesto.

Debido al aumento de la estabilidad primaria conseguida en esta fase de experimentación animal, las corticales mostraron en general un mejor aspecto que en la primera implantación respecto a la ocupación de los huecos dejados por la rosca del implante, produciéndose ésta sin presencia de fibrosis intermedia.

Debido al proceso quirúrgico de implantación, aunque se consiguió una mayor estabilidad primaria, también se produjo un aumento en el traumatismo de las corticales evidenciado por la presencia, en muchos casos, de microfracturas. La formación de microfracturas óseas activa la liberación de factores y citoquinas que promueven la remodelación ósea. Sea por ello o no, se observó hueso, tanto maduro como inmaduro, ocupando los espacios vacíos entre el recubrimiento (que no degradó) y el hueso. El nivel de osteointegración de la cortical del recubrimiento 7M3T mejoró ligeramente cuando se añadió gelatina, siendo algo más evidente quizá en la segunda semana. La osteointegración alcanzada por el recubrimiento 3X pareció menos que la alcanzada por la familia 7M3T.

Osteointegración en hueso trabecular

Alcanzar la estabilidad secundaria es un factor clave para el éxito a largo plazo de un implante dental y es debida a la regeneración de hueso trabecular alrededor del implante. Los cambios en el modelo animal, comentados ya en esta segunda implantación, consiguieron un aumento en la estabilidad primaria de los implantes, favoreciendo la formación de nuevo hueso trabecular y por tanto alcanzando una mayor estabilidad biológica de los implantes evaluados.

A continuación, se muestra la formación de nuevo hueso trabecular, mediante formación de espículas activas que van engrosándose formando trabéculas óseas inmaduras las cuales irán alcanzando un mayor grado de calcificación hasta formar trabéculas óseas maduras, encontradas para cada tipo de recubrimiento y el Control.

En los implantes recubiertos con la formulación 7M3T, se observó la activación del endostio de la cortical de inserción, favoreciendo la formación de espículas activas. Las espículas, formadas desde el endostio, continuaron creciendo y madurando, alcanzando la superficie del implante y avanzando por su superficie, formando trabéculas ramificadas y maduras tras 2 semanas (Figura 123).

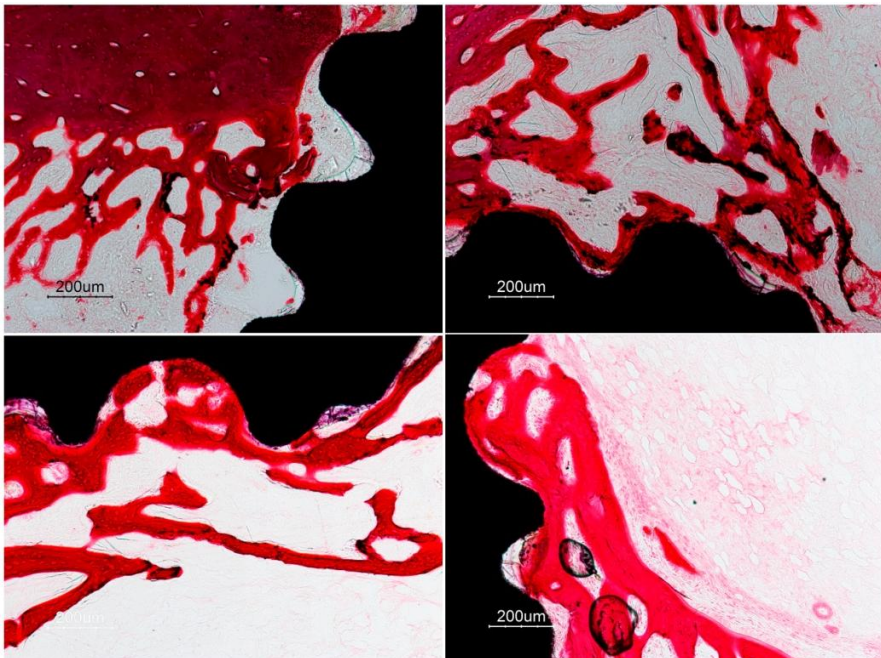


Figura 123. Osteointegración del hueso trabecular para el recubrimiento 7M3T donde, tras 1 semana de implantación, se observaron espículas activas (arriba) que fueron madurando hasta formar trabéculas ramificadas y maduras tras 2 semanas de implantación (abajo).

Funcionalizar el recubrimiento 7M3T con gelatina pareció, tras 2 semanas de implantación, favorecer más la formación de nuevas trabéculas alrededor del implante (Figura 124).

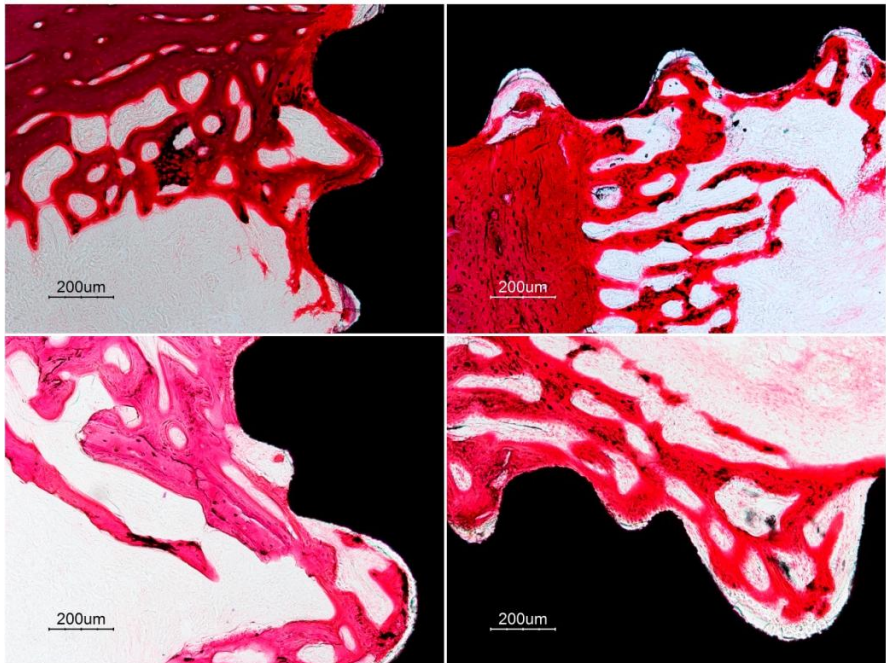


Figura 124. Osteointegración del hueso trabecular para el recubrimiento 7M3T+G; tras 1 semana de implantación (arriba) se formaron espículas activas que tras 2 semanas de implantación formaron trabéculas ramificadas y maduras (abajo). Cualitativamente, la adición de gelatina al recubrimiento 7M3T favoreció la formación de nuevo hueso trabecular tras 2 semanas de implantación.

En el análisis de las muestras recubiertas con la formulación 3X, encontramos que las espículas formadas en la primera semana fueron espículas rectas y poco ramificadas que no llegaron a superar la cabeza del implante. A dos semanas, estas espículas consiguieron formar un hueso trabecular ramificado como el presente en el resto de materiales desde la primera semana (Figura 125).

En el estudio de las muestras Control se observó la misma formación de espículas activas que la observada para los recubrimientos de la formulación 7M3T sin y con gelatina, transformándose éstas también en trabéculas ramificadas y maduras tras 2 semanas de implantación (Figura 126).

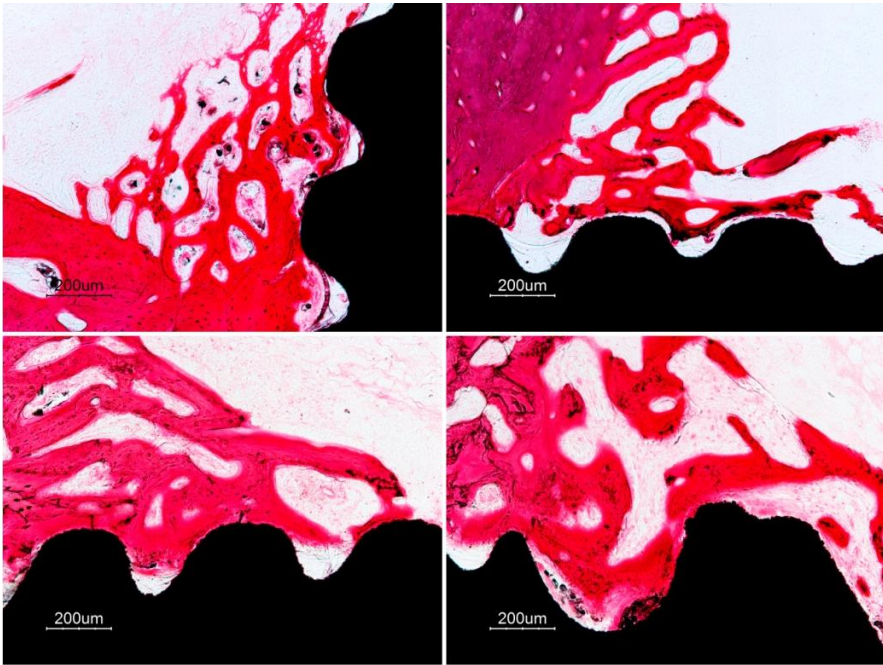


Figura 125. Osteointegración del hueso trabecular para el recubrimiento 3X; formación de espículas rectas y poco ramificadas tras 1 semana de implantación (arriba) que tras 2 semanas de implantación (abajo) consiguen finalmente formar trabéculas ramificadas y maduras.

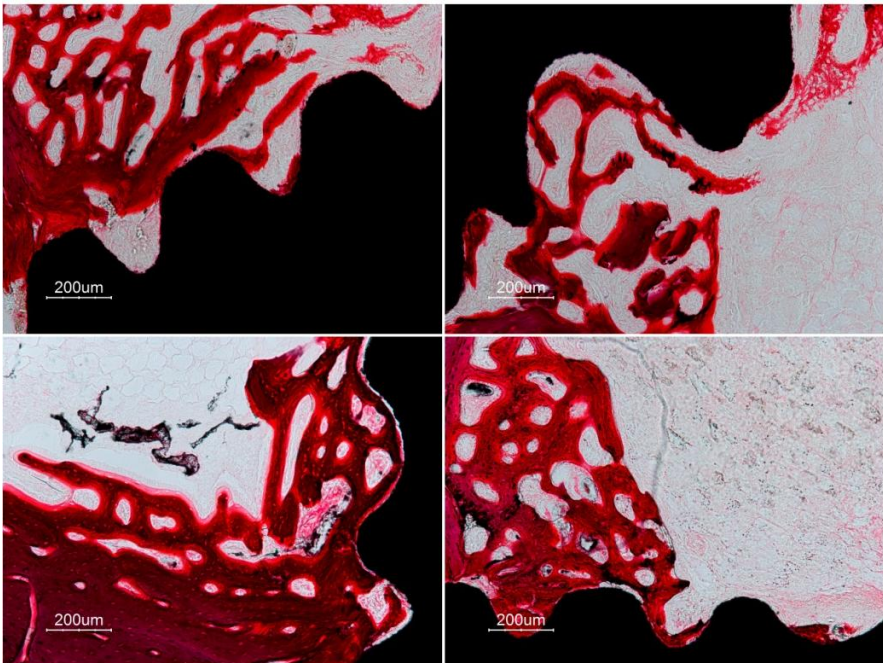


Figura 126. Osteointegración del hueso trabecular para el Control; formación de espículas óseas debido a la activación del endostio tras 1 semana de implantación (arriba) y formación de

trabéculas maduras tras 2 semanas de implantación (abajo), tal y como se observó para 7M3T y 7M3T+G.

Puesto que en esta segunda experimentación animal se procuró que el extremo apical de los implantes apoyara en la cortical opuesta al lugar de implantación en la tibia para lograr una mayor estabilidad primaria de los implantes, también fue estudiado el grado de osteointegración en estas zonas. El contacto del extremo apical de los implantes estimuló el endostio, favoreciéndose la formación de nuevo hueso trabecular a su alrededor. Para todos los recubrimientos y el Control, se observó activación del endostio de la cortical opuesta cuando el extremo apical se encontró en contacto con éste o muy próximo a él. Tras 1 semana de implantación se observaron espículas y trabéculas finas e inmaduras (Figura 127).

Las espículas óseas formadas tras la primera semana se ensancharon y maduraron durante la segunda semana de implantación hasta formar nuevo hueso trabecular que sostuvo el extremo apical de los implantes (Figura 128).

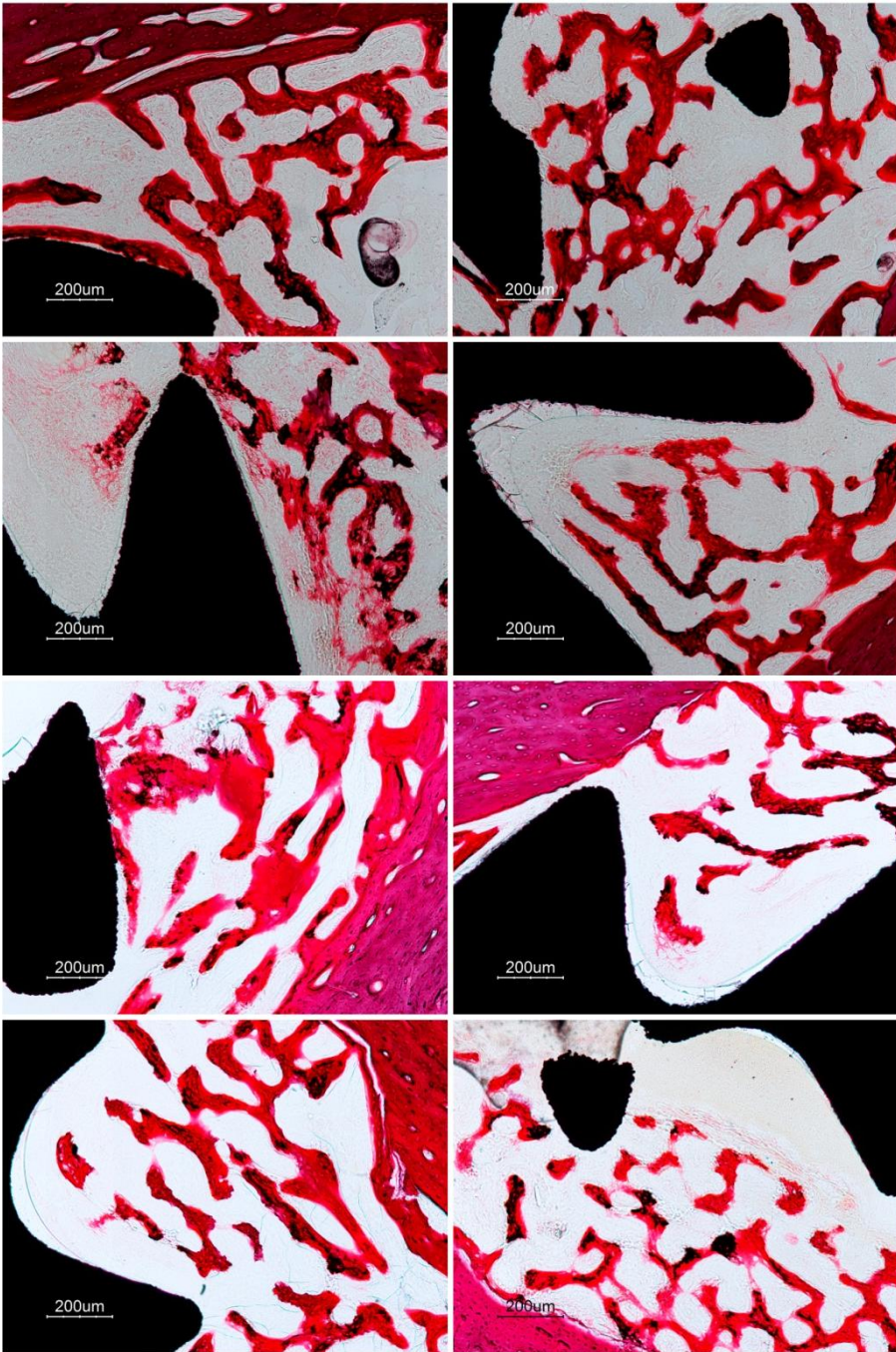


Figura 127. Formación de espículas óseas debido a la activación de la cortical opuesta al lugar de implantación tras 1 semana de implantación; Control (imágenes de arriba); recubrimiento 7M3T (imágenes de la segunda fila), recubrimiento 7M3T+G (imágenes de la tercera fila) y recubrimiento 3X (imágenes de abajo).

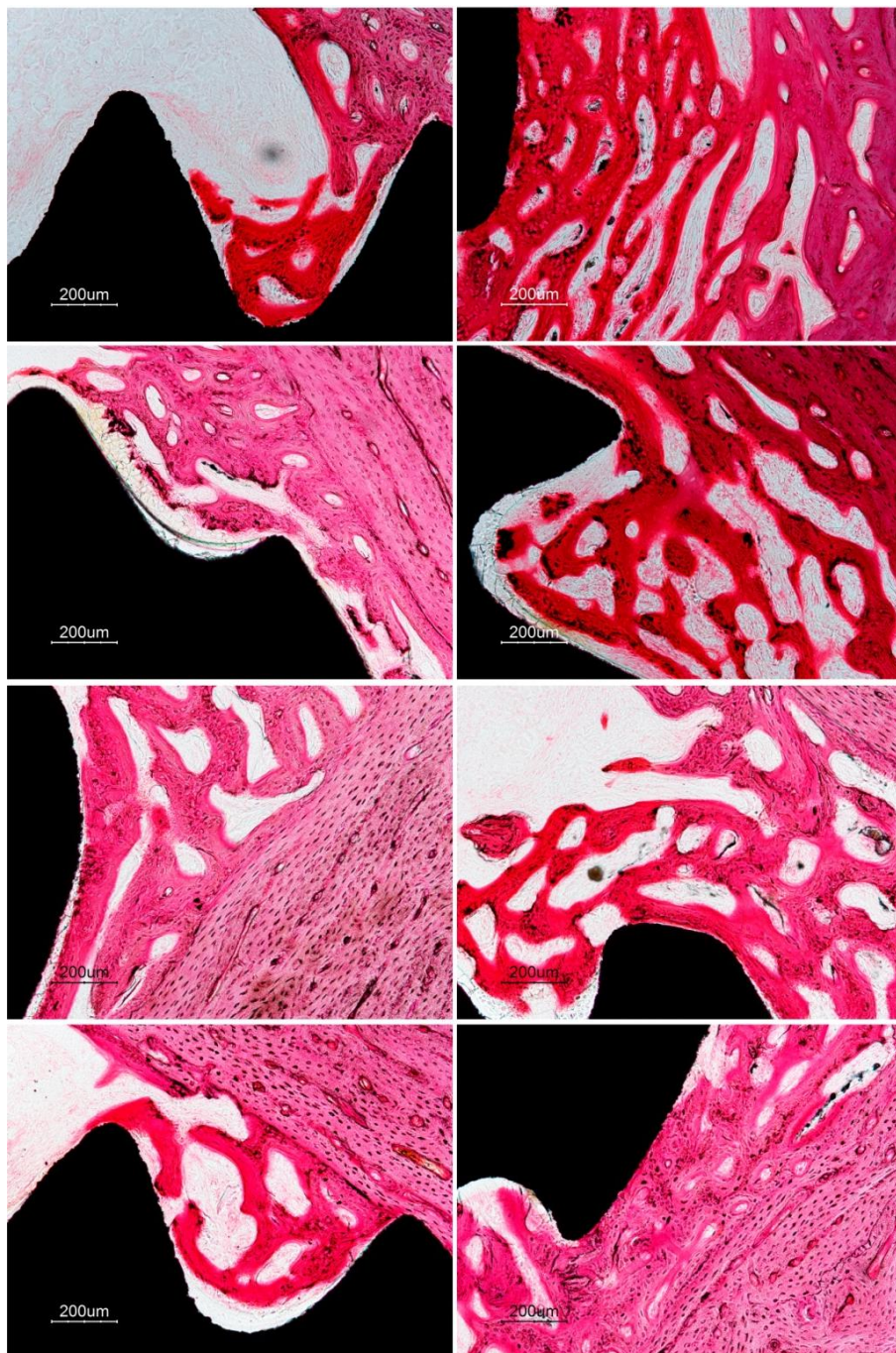


Figura 128. Formación de trabéculas maduras en el extremo apical de los implantes tras 1 semana de implantación; Control (imágenes de arriba); recubrimiento 7M3T (imágenes de la segunda fila), recubrimiento 7M3T+G (imágenes de la tercera fila) y recubrimiento 3X (imágenes de abajo).

Las diferencias, encontradas en el grado de osteointegración del extremo apical de los recubrimientos, estuvieron relacionadas no ya con el tipo de material en la superficie de los implantes si no con la distancia del implante al endostio.

Activación osteoblástica

La activación del endostio, tanto de la cortical de inserción como de la cortical opuesta, fue la misma para 7M3T con y sin gelatina. La activación en estos recubrimientos fue superior que la encontrada en el recubrimiento 3X (Figura 129). Para todos los materiales, incluido el Control, la activación de las corticales fue superior en la segunda semana de implantación, excepto para el recubrimiento 3X cuya activación no varió de 1 a 2 semanas.

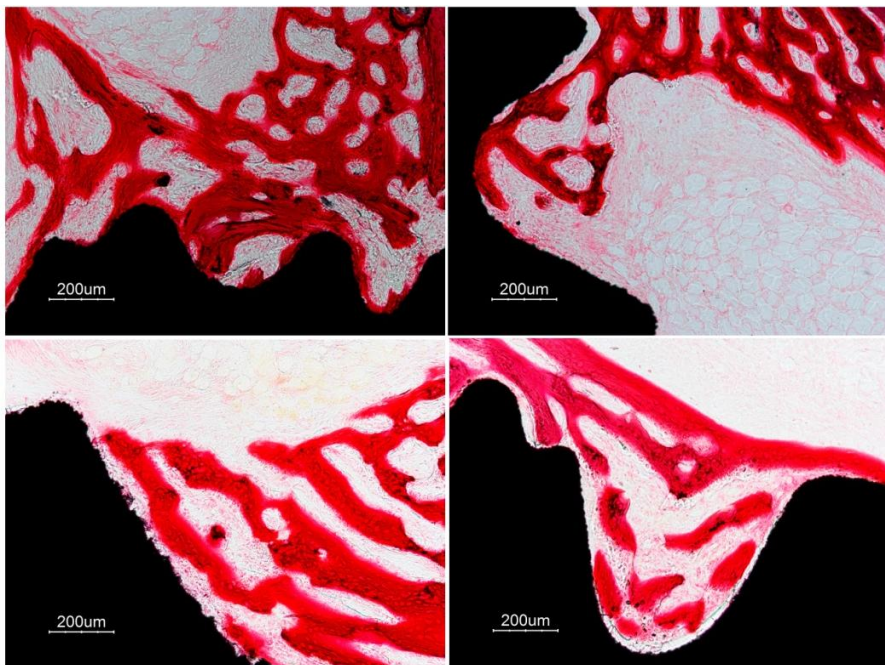


Figura 129. Activación osteoblástica encontrada tras 2 semanas de implantación; Control (arriba izquierda), recubrimiento 7M3T (arriba derecha), recubrimiento 7M3T+G (abajo izquierda) y recubrimiento 3X (abajo derecha).

La activación del endostio de la cortical proximal, para la formación de nuevo hueso trabecular, no sobrepasó en ningún caso el primer valle del cuerpo del implante. El hueso trabecular alcanzó zonas más alejadas del endostio en la segunda semana de implantación que en la primera, a excepción del recubrimiento 3X que no mejoró con el tiempo (Figura 130).

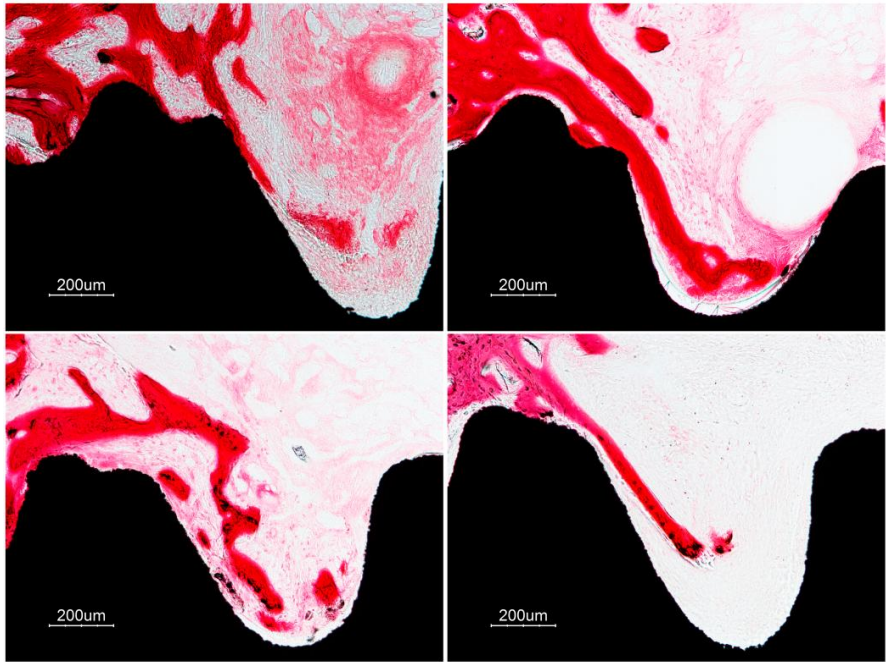


Figura 130. Alcance del nuevo hueso trabecular formado por estimulación del endostio de la cortical de inserción tras 2 semanas de implantación; Control (arriba izquierda); recubrimiento 7M3T (arriba derecha); recubrimiento 7M3T+G (debajo izquierda); y recubrimiento 3X (debajo derecha). Ningún material consiguió sobrepasar el primer valle del cuerpo de los implantes.

Durante el estudio cualitativo de la osteointegración, se observó claramente el fenómeno de osteoconducción del titanio (Figura 131) en las muestras Control. Este fenómeno favoreció que la nueva formación de hueso trabecular discurriera pegada a la superficie del implante, observándose con muy poca frecuencia en el caso de que el titanio estuviera recubierto.

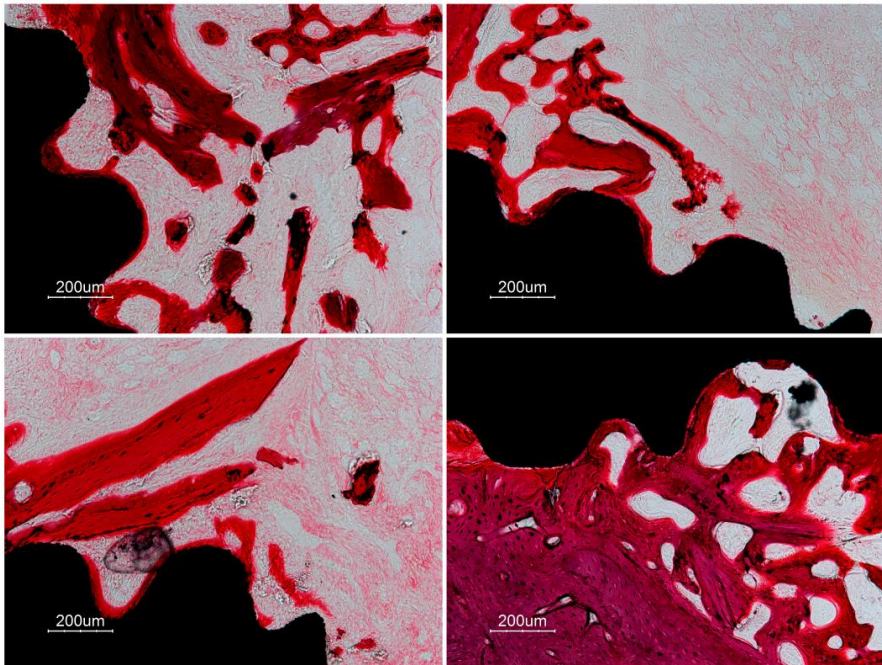


Figura 131. Fenómeno de osteoconducción del titanio observado en el análisis de las imágenes histológicas pertenecientes al grupo Control tras 1 semana (arriba) y 2 semanas de implantación (abajo).

3.2.2.2. Histomorfometría Panorámica

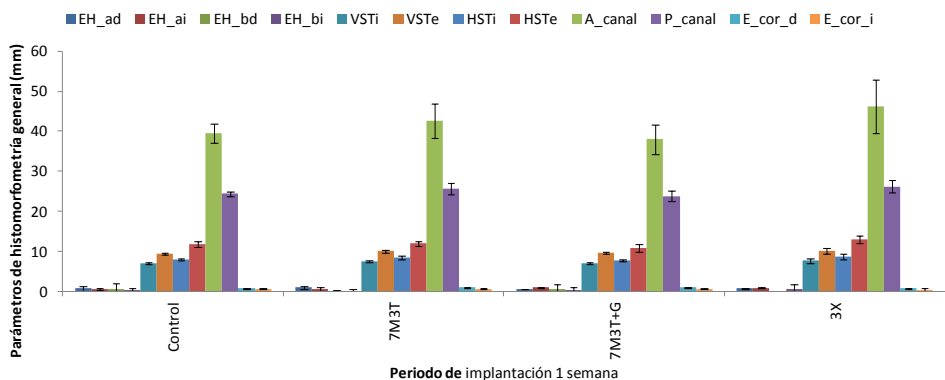
Con el objetivo de observar si existían diferencias entre el lugar de implantación de las prótesis implantadas en la segunda fase experimental, se realizó un estudio de **Histomorfometría Panorámica**. A partir de las imágenes panorámicas, como la de la Figura 132, obtenidas mediante macroscopio, se realizaron distintas mediciones para evaluar la posición de cada implante en la porción proximal de la tibia, el alcance de la formación de nuevo hueso trabecular a lo largo del implante y el éxito del modelo experimental.



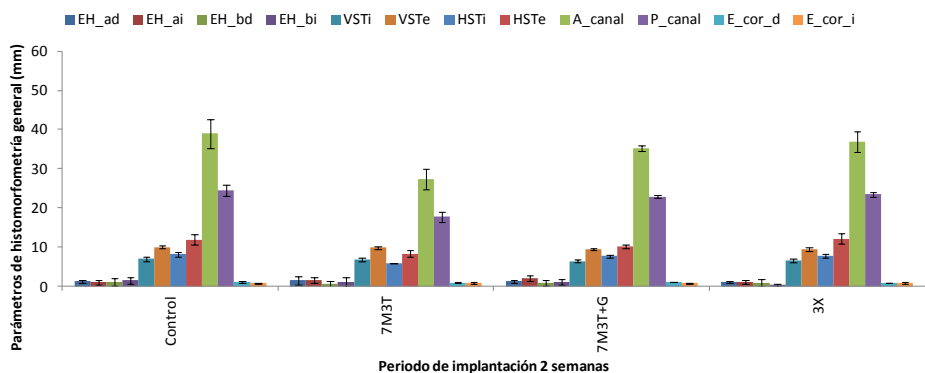
Figura 132. Imagen panorámica utilizada para las mediciones de la **Histomorfometría Panorámica**, tomada con macroscopio, de un recubrimiento tras 1 semana de implantación.

Las variables escogidas para este estudio fueron, igual que en el estudio de la primera fase experimental: la longitud (VSTi) y anchura internos de la tibia (HSTi), la longitud (VSTe) y anchura externos de la tibia (HSTe), el espesor de las corticales (derecha E_cor_d e izquierda E_cor_i), el área (A_canal) y perímetro (P_canal) del canal medular, el alcance del hueso trabecular desde el endostio a lo largo del implante (derecha EH_ad e izquierda EH_ai) y el contacto del implante con la cortical opuesta (derecha EH_bd e izquierda EH_bi). La medición de cada parámetro y el estudio estadístico se realizaron tal y como se describió en el Capítulo 3.

Como resultado del estudio de **Histomorfometría Panorámica**, se observaron diferencias entre la localización de las prótesis implantadas. El estudio estadístico reveló que a 1 semana el recubrimiento 3X estaba implantado más proximal que el resto y el Control más distalmente en la tibia. Para 2 semanas, sin embargo, el Control fue implantado más proximal, seguido de 7M3T, después 3X y, finalmente, el más distal fue 7M3T+G, aunque estas diferencias a 2 semanas no fueron significativas (Gráfica 32 y Gráfica 33).



Gráfica 32. Valores de la **Histomorfometría Panorámica** para los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X y el Control tras 1 semana de implantación para las variables; alcance del hueso trabecular desde el endostio a lo largo del implante (derecha EH_ad e izquierda EH_ai); contacto del implante con la cortical opuesta (derecha EH_bd e izquierda EH_bi); longitud de la tibia (interna VSTi y externa VSTe); anchura de la tibia (interna HSTi y externa HSTe); área del canal medular (A_canal), perímetro del canal medular (P_canal); y espesor de las corticales (derecha E_cor_d e izquierda E_cor_i).



Gráfica 33. Valores de la **Histomorfometría Panorámica** para los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X y el Control tras 2 semanas de implantación para las variables; alcance del hueso trabecular desde el endostio a lo largo del implante (derecha EH_ad e izquierda EH_ai); contacto del implante con la cortical opuesta (derecha EH_bd e izquierda EH_bi); longitud de la tibia (interna VSTi y externa VSTe); anchura de la tibia (interna HSTi y externa HSTe); área del canal medular (A_canal), perímetro del canal medular (P_canal); y espesor de las corticales (derecha E_cor_d e izquierda E_cor_i).

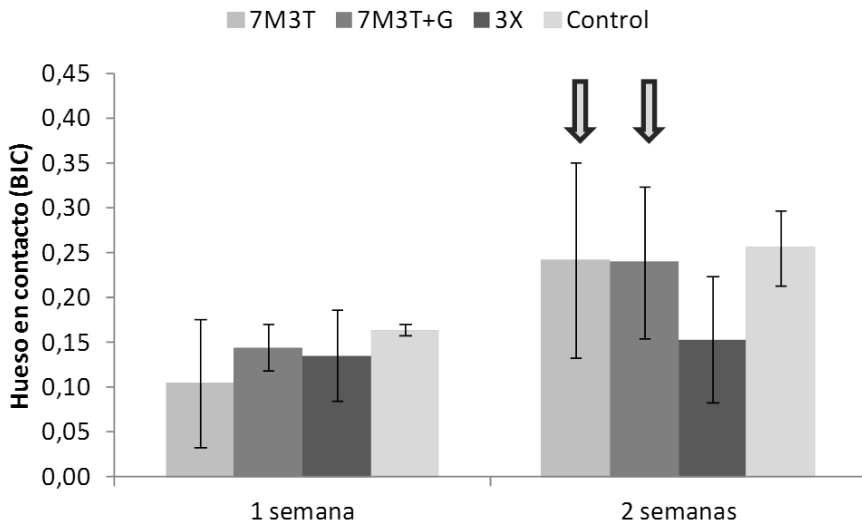
Se observó que el lugar de implantación a lo largo del eje longitudinal de la tibia, dentro de las localizaciones donde las prótesis fueron implantadas, no tuvo consecuencia directa con el alcance del nuevo hueso trabecular. Tampoco tuvo consecuencias en la cortical donde se realizó el defecto para la implantación, ni en la cortical opuesta a la zona de inserción en contacto con la zona apical de las prótesis.

3.2.2.3. Histomorfometría Detallada

Tras la **Histomorfometría Panorámica**, se realizó una **Histomorfometría Detallada de la Fase de Caracterización II**, en la cual se estudiaron las variables histomorfométricas de **Hueso en contacto con el implante**, **Hueso entre roscas** y **Hueso peri-implante**. Este estudio resultó determinante para cuantificar la capacidad de osteointegración de los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X en comparación con el titanio (Control).

El montaje de las imágenes histológicas a 10X de cada implante permitió contar con una imagen total, de cada muestra, con el detalle suficiente para analizarlas y tomar las medidas histomorfométricas.

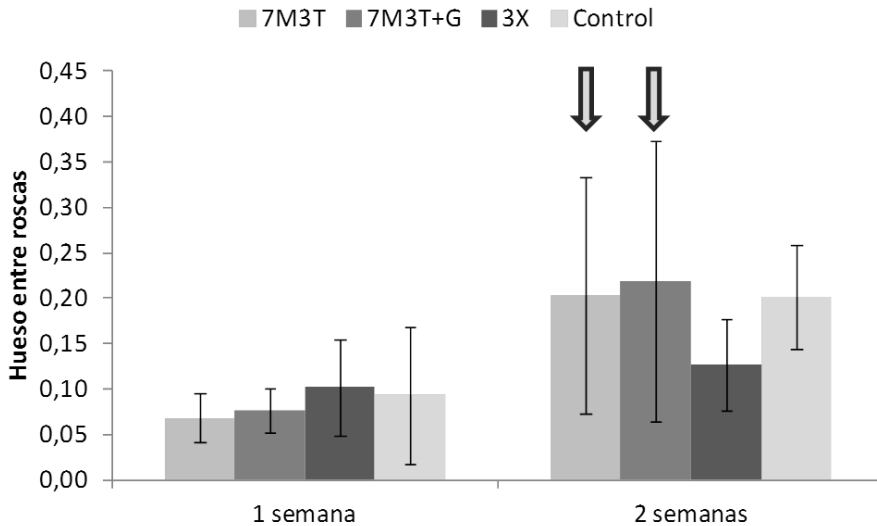
Para la variable **Hueso en contacto con el implante** (cantidad de hueso en íntimo contacto con la superficie del implante, expresada en milímetros) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos materiales, incluido el Control (Gráfica 34). Se observó el mismo comportamiento a dos semanas del recubrimiento 7M3T puro y el funcionalizado con gelatina.



Gráfica 34. Valores para la variable histomorfométrica de **Hueso en contacto con el implante** para los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X y el Control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para ningún periodo. Los recubrimientos 7M3T y 7M3T+G indujeron de igual modo la formación de hueso en contacto con el implante para dos semanas (flechas).

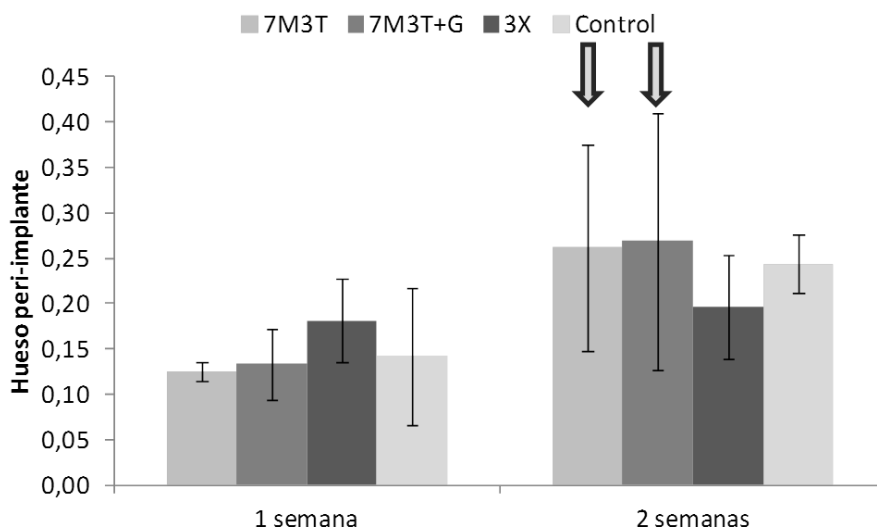
Para la variable **Hueso entre roscas** (cantidad de hueso en el espacio disponible dentro de las roscas), tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos materiales ni con el Control (Gráfica 35). Aquí también

se observó el mismo comportamiento a dos semanas del recubrimiento 7M3T y su homólogo funcionalizado.



Gráfica 35. Valores para la variable histomorfométrica de *Hueso entre roscas* para los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X y el Control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para ningún periodo. Los recubrimientos 7M3T y 7M3T+G indujeron de igual modo la formación de hueso entre roscas para dos semanas (flechas).

Para la variable *Hueso peri-implante* (cantidad de hueso dentro de la región de interés peri-implante (ROIp) con relación a la superficie total disponible dentro de la ROIp), tampoco se encontraron diferencias significativas entre los materiales ni con el Control. En este caso, también se observó el mismo comportamiento observado en las dos variables anteriores para los recubrimientos 7M3T y 7M3T+G tras dos semanas de implantación (Gráfica 36).



Gráfica 36. Valores para la variable histomorfométrica de *Hueso peri-implante* para los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X y el Control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para ningún periodo. Los recubrimientos 7M3T y 7M3T+G indujeron de igual modo la formación de hueso peri-implante para dos semanas (flechas).

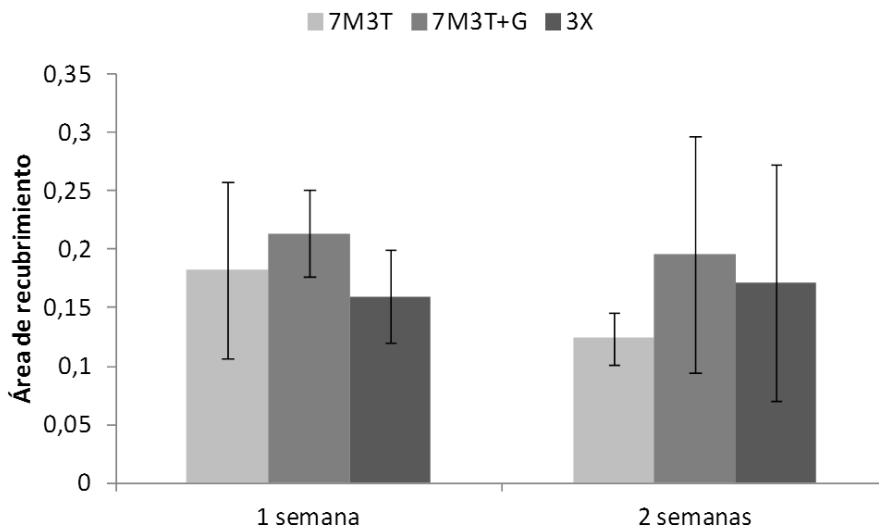
Pese a las diferencias que se pudieron observar en el estudio histológico previo, el estudio estadístico de las variables histomorfométricas demostró la misma capacidad de osteointegración para todos los recubrimientos que para el titanio (Control). Los recubrimientos no se interpusieron en la osteointegración de los implantes, permitiendo la osteointegración completa de los implantes recubiertos, al igual que de los implantes sin recubrir.

3.2.3. Degradación sol-gel *in vivo*

Con el objetivo de determinar la degradación *in vivo* de los recubrimientos, se realizó una cuantificación del recubrimiento mediante análisis de las imágenes histológicas tomadas mediante microscopía óptica a 10X.

La Gráfica 37 muestra el área ocupada por el recubrimiento en cada uno de los periodos de estudio de implantación animal, expresada en milímetros cuadrados (mm^2). Esta cuantificación mostró, que a una semana, la menor cantidad de recubrimiento fue para 3X, seguido de 7M3T que mostró la mayor variabilidad. A dos semanas, comparando con los valores a una semana, observamos que el recubrimiento con un mayor descenso fue 7M3T. Por lo que el recubrimiento que mayor degradación *in vivo* mostró fue 7M3T. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la degradación de los distintos recubrimientos, para

ninguno de los dos periodos de estudio, ni diferencias entre la degradación a 1 y 2 semanas, para cada uno de los recubrimientos.



Gráfica 37. Valores para el Área de recubrimiento para los recubrimientos 7M3T, 7M3T+G y 3X y el Control.

Si observamos los valores para 7M3T+G y 3X para dos semanas, observaremos que algunos de sus valores superaron los de la primera semana. Esto indica, una vez más, la gran variabilidad del espesor de los recubrimientos, tal y como sugirió la observación de la deposición del recubrimiento mediante FESEM y microscopía óptica en la caracterización físico-química. Además, se pone de relevancia la diferente dinámica de degradación de los recubrimientos según el microentorno del ensayo, ya que el microentorno que proporciona un organismo vivo no es comparable al encontrado en el ensayo *in vitro*.

4. Discusión

En todos los casos se obtuvo un sol transparente y sin precipitados, con una viscosidad adecuada para obtener una correcta aplicación sobre el metal (Figura 89). La adición de gelatina redujo considerablemente la rugosidad del titanio (Figura 91, Tabla 18). Se consiguió una correcta adherencia al titanio de todos los recubrimientos, resistiendo el procedimiento quirúrgico de implantación clínica *in vivo* en tibia de conejo (Figura 93). En esta ocasión, los recubrimientos con mayor degradación *in vitro* fueron 7M3T y 7M3T+G (Gráfica 23), en la implantación *in vivo* se observaron todos los recubrimientos a 1 y 2 semanas de implantación ya que, como se viera en

implantaciones anteriores, la desaparición del recubrimiento por degradación ocurre a partir de las 4 semanas de implantación.

Todos los recubrimientos resultaron bioactivos, ya que al verse expuestos a fluidos corporales reaccionan químicamente dando lugar a la formación de un fuerte enlace entre el implante y el tejido (Figura 92), y no citotóxicos (Gráfica 27). Pese a que los valores de adhesión fueron mayores para el recubrimiento con gelatina (Gráfica 28), y pese a que los valores de ángulo de contacto se alejaban del óptimo de 70° [238] (Tabla 20), la calidad de la adhesión fue superada por el recubrimiento 3X, el titanio (Control) y el Control + (Thermanox®), observándose en ellos un mejor marcaje para todas las proteínas de adhesión y una mejor conformación del citoesqueleto (Figura 97 - Figura 102). La alta tasa de degradación de 7M3T y 7M3T+G pudiera proporcionar una superficie muy inestable para la adhesión proteica y celular [2]. Todos los recubrimientos indujeron diferenciación osteoblástica. El recubrimiento 3X y los controles (Control y Control +) mostraron una expresión más temprana para Runx2 (Figura 106), mientras que 7M3T+G mostró una mayor tasa de actividad de ALP tanto a 1 como a 2 semanas (Gráfica 30). Para todos se obtuvo expresión para Opn y Bsp (Figura 105), contando con una población osteoblástica madura [251] que induciría la formación de la línea cementada para la formación de hueso *de novo* [2].

En esta **Fase de Caracterización II** se introdujo ciertas modificaciones del modelo experimental animal empleado en la fase anterior: (1) se implantó tan sólo una prótesis radicular por tibia, (2) se implantó en tibia proximal (3) con cierta inclinación para permitir implantar las prótesis en toda su longitud de modo que (4) el extremo apical de la prótesis apoyara en la cortical opuesta al lugar de la implantación. Estas modificaciones llevaron a conseguir una mayor estabilidad primaria del implante que evitó la formación de tejido fibroso interpuesto entre los implantes y el hueso.

Todos los materiales indujeron el mismo nivel de osteointegración con el hueso (Gráfica 34 - Gráfica 36) y mostraron el mismo comportamiento con los tejidos vivos (Gráfica 31), aún mostrando algunas diferencias en la localización de implantación (Gráfica 32 y Gráfica 33) y aún siendo la superficie del Control no bioactiva. Indicar que, como se vio en la **Fase de Caracterización I** y se ha visto en la **Fase de Caracterización II**, la degradación *in vivo* depende mucho de la proximidad del recubrimiento al endostio, ya que la osteogénesis a distancia parte de aquí pero sólo alcanza cierta distancia. Las zonas de recubrimiento alejadas del endostio, bien sea lateral, apical o proximal al implante, mostraron una menor degradación.

Los valores para los tres parámetros histomorfométricos fueron muy similares, indicando que el nuevo hueso formado por osteogénesis a distancia finalmente

consigue contactar con la superficie del recubrimiento, o bien, que hay mayor proporción de neoformación ósea debida a osteogénesis por contacto. En los implantes de titanio se observó mayor grado de osteogénesis por contacto y el fenómeno de osteoconducción (Figura 131). Sin embargo, para los recubrimientos el mecanismo de osteointegración fue en gran medida debida a osteogénesis a distancia (Figura 123), debido, posiblemente, a la inducción del silicio liberado y a que la superficie del titanio no estaba disponible. Aún siendo los mecanismos de regeneración ósea diferentes, no se encontraron diferencias en el grado de osteointegración alcanzado entre el titanio y los recubrimientos. El recubrimiento 7M3T+G siguió la misma tendencia que el recubrimiento sin funcionalizar. Ni la adición de gelatina ni de GPTMS consiguió mejorar la osteointegración de 7M3T (Gráfica 34 - Gráfica 36).

El modelo de osteointegración de implantes dentales en tibia de conejo es un modelo animal establecido en la comunidad científica [172, 192, 196, 197, 198, 199, 200]. La normativa establece el uso de los huesos largos en conejo para la implantación de muestras, limitando el tamaño a 2 mm de diámetro y 6 mm de longitud para muestras cilíndricas [172]. La problemática que existe en relación a este aspecto, es el uso de este modelo para la evaluación de la osteointegración de implantes dentales comerciales. Los implantes dentales existentes en el mercado están disponibles en diversas tallas, pero incluso la menor de ellas excede a las medidas recomendadas por la Organización Internacional de Estandarización (ISO, del inglés *International Organization for Standardization*). Así pues, encontramos implantes dentales en tibia proximal de conejo de 3,5 mm de diámetro por 7 mm de largo [196], 3,3 mm de diámetro por 6 mm de largo [199], 3,3 mm de diámetro por 8 mm de largo [200], 3,75 mm de diámetro por 7 mm de largo [255] o como los implantados por Mori de 3,5 mm de diámetro por 10 mm de largo [198], cuyo extremo apical atraviesa completamente la cortical opuesta al lugar de inserción. En metáfisis proximal tibial encontramos dimensiones de implantes dentales de 3,3 mm de diámetro por 8,5 mm de largo [232], 3,75 mm de diámetro por 8 mm de largo [256] y 3,5 mm de diámetro por 8 mm de largo [257]. Ivanoff realizó un estudio sobre cómo afecta el diámetro de implantes dentales en la osteointegración en tibia de conejo [258], concluyó que diámetros mayores incrementan la estabilidad primaria porque aumenta la superficie de contacto con el hueso cortical, encontrando una correlación entre el par de retirada del implante y el hueso en contacto con el implante para implantes dentales de 3,75mm de diámetro. Muchos autores no especifican si la implantación está realizada en metáfisis proximal tibial, tan sólo indican que el lugar de la implantación es tibia proximal. La verdadera metáfisis tibial proximal tiene muy poco espesor, por lo que es

muy difícil asegurarse que, realmente, se está implantando en metáfisis y, además, que esa implantación sea reproducible en todos los conejos empleados en el estudio. Además, la longitud de los implantes exige que la implantación sea lo más proximal posible (sin invadir la zona epifisaria) para evitar atravesar la cortical opuesta o dejar la cabeza del implante sin contacto con la cortical. Así pues, como se dijo anteriormente, el método de implantación empleado en la **Fase de Caracterización II**, consiguiendo que el extremo apical apoyara en la cortical opuesta al lugar de inserción en la tibia, otorgó un aumento de la estabilidad primaria consiguiendo un mayor contacto del hueso con los recubrimientos y el Control, permitió implantar las prótesis en toda su longitud y evitó la formación de tejido fibroso interpuesto entre el hueso, tanto cortical como trabecular, y el implante [60, 259, 61].

Es difícil encontrar publicaciones sobre ensayos *in vivo* de materiales sol-gel no sinterizados, ya que la mayoría de los que existen en bibliografía hacen referencia a materiales sinterizados, evaluados en distintos modelos animales como rata y ratón [141, 186], conejo [172, 173, 260, 186, 183] o cabra [261]. De los materiales sol-gel no sinterizados a altas temperaturas, que podemos encontrar en la bibliografía actual, su biocompatibilidad fue evaluada mediante implantación *in vivo* subcutánea en rata [189] o conejo [190, 142] e implantación en cresta ilíaca de conejo [142]. Todos ellos fueron diseñados con un objetivo distinto al de la inducir la osteointegración de implantes. Fueron diseñados como vehículos de liberación de biomoléculas para el tratamiento de las infecciones ósea [142], como vehículos de liberación de insulina [189], o como recubrimientos para sensores de glucosa implantables subcutáneamente [190]. Para demostrar que sus materiales diseñados para tratar infecciones óseas, sintetizados vía sol-gel, eran biocompatibles con el tejido óseo, Radin implantó gránulos de xerogel basados en trimetil ortosilicato (TMOS) y con distintas concentraciones de SiO₂ en cresta ilíaca de conejo [142]. Observó que alrededor de las paredes de los gránulos se formaba nuevo hueso trabecular. Sin embargo, no encontró diferencias significativas entre sus materiales y el control (defecto vacío) para el hueso nuevo formado en el área de implantación, ni tras 2 ni 4 semanas de implantación, siendo su tamaño muestral de n = 9. Por ello, concluye que sus materiales son buenos candidatos para la liberación controlada de fármacos para el tratamiento de infecciones óseas y como posibles vehículos de liberación de otros fármacos y biomoléculas para aplicación en el campo de la biomedicina [142].

El aumento de la estabilidad primaria conseguida por las modificaciones en el modelo animal hizo que se observara, en comparación con la fase experimental anterior, una mayor osteointegración del titanio que reduciría las diferencias entre el Control y el resto de recubrimientos en esta segunda fase experimental. En la Figura

133 se muestra una comparativa de los parámetros histomorfométricos obtenidos en la experimentación animal de la **Fase de Caracterización I** (izquierda) y los obtenidos en la **Fase de Caracterización II** (derecha) tras la primera y segunda semana de implantación. En ella se puede observar una diferencia entre las tendencias del Control en la primera y segunda fases experimentales. Mientras que el Control no mostró una variación de la capacidad de osteointegración con el tiempo en la primera experimentación, en la segunda se puede prever un aumento tras periodos de estudio más largos (Figura 133).

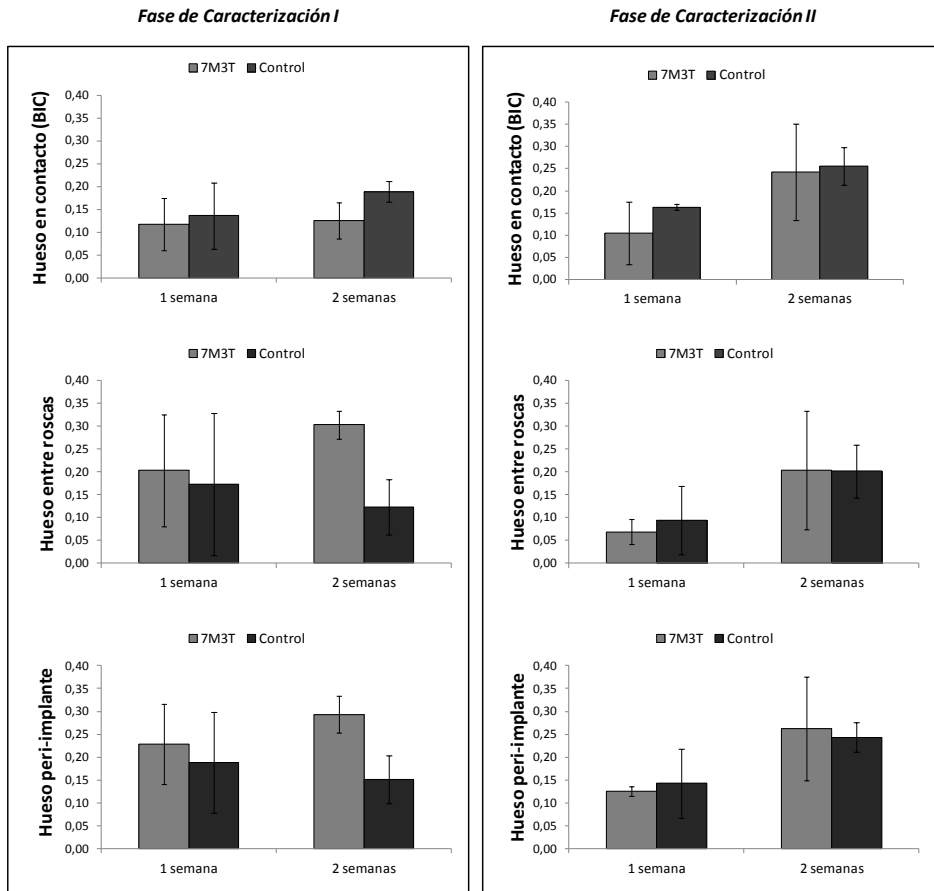


Figura 133. Comparativa de los parámetros histomorfométricos obtenidos en la experimentación animal de la **Fase de Caracterización I** (izquierda) y los obtenidos en la **Fase de Caracterización II** (derecha) tras la primera y segunda semana de implantación.

De este modo, 7M3T y Control mostraron una tendencia común en su capacidad de inducir la osteointegración del implante en la **Fase de Caracterización II**, de modo que parece que en ausencia de estabilidad primaria la capacidad de osteoinducción del recubrimiento destaque más, puesto que no parece propiciada la

capacidad de osteoconducción del titanio. El recubrimiento 7M3T+G mostró la misma tendencia que el 7M3T sin funcionalizar. La ventaja del recubrimiento 3X, residiría en la capacidad de osteoinducción que le confirieran las biomoléculas ancladas a sus grupos epoxi.

5. Conclusión

Los recubrimientos con mayor tasa de degradación fueron 7M3T y 7M3T+G. 7M3T+G indujo mayores valores de adhesión y ALP en osteoblastos, siendo sin embargo 3X el que mayor calidad de adhesión y mejor morfología osteoblástica mostró. Todos los recubrimientos indujeron la diferenciación *in vitro*, siendo más temprana para 3X. Ninguno de ellos mostró efectos nocivos ni celulares (*in vitro*) ni sobre los tejidos adyacentes al lugar de implantación (*in vivo*).

No se apreciaron diferencias entre los recubrimientos y el Control para ninguno de los parámetros histomorfométricos. El aumento de la estabilidad primaria, debido a las modificaciones en el modelo experimental, impidió la formación de tejido fibroso interpuesto entre el hueso (ni cortical ni trabecular) y el implante, para ninguno de los materiales. Este aumento en la estabilidad primaria reduciría las diferencias entre el Control y el resto de recubrimientos en esta segunda fase experimental, de lo que se podría plantear la posibilidad de que el recubrimiento 7M3T pudiera resultar una ventaja en condiciones clínicas adversas de estabilidad primaria insuficiente debidas a la baja calidad ósea de los pacientes, al igual que pudiera suceder con el recubrimiento 7M3T+G que mostró la misma tendencia que el recubrimientos sin funcionalizar. Un nuevo modelo animal capaz de evaluar la capacidad osteoinductora en presencia o ausencia de estabilidad primaria podría determinar la ventaja de estos recubrimientos en situaciones clínicas de insuficiente estabilidad primaria.

Al igual que concluyera Radin con sus recubrimientos sol-gel [137], el recubrimiento 3X constituiría un prometedor vehículo de liberación controlada de biomoléculas que supusieran una ventaja competitiva en el proceso de osteointegración de los implantes dentales de titanio en beneficio de los pacientes.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

De la investigación realizada en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los recubrimientos evaluados *in vitro* resultaron no citotóxicos, bioactivos y degradables, induciendo todos ellos la proliferación y diferenciación osteoblástica.
2. Los recubrimientos con mayor tasa de degradación ofrecen una peor superficie de adhesión osteoblástica, debido a ello los osteoblastos muestran *in vitro* una baja calidad de adhesión celular.
3. La imposibilidad de que las células se adhieran correctamente a la superficie inestable de los recubrimientos, debido a su degradación, se traduce *in vivo* en una modificación del proceso de osteointegración. Mientras que el titanio se osteointegra mediante osteogénesis por contacto, los recubrimientos inducen la nueva formación de hueso por osteogénesis a distancia.
4. Los recubrimientos 5V5G y 5M5G, que no consiguen degradar completamente tras 8 semanas de implantación, inducen formación de cápsula fibrosa interpuesta entre el hueso y el implante. Por el contrario, el recubrimiento 7M3T degrada completamente tras 8 semanas de implantación, dejando la superficie libre del titanio, aumentando el hueso en contacto con el implante, sin tejido fibroso interpuesto. El recubrimiento 7M3T+G sigue la misma tendencia *in vivo* que el 7M3T. El recubrimiento 3X muestra mucha similitud con 7M3T y 7M3T+G.
5. La capacidad de osteointegración del titanio parece verse influenciada por el grado de estabilidad primaria del implante, osteointegrándose peor cuando el grado de estabilidad tras la implantación es insuficiente. Sin embargo, este factor parece afectar en menor grado cuando el titanio se encuentra recubierto con la formulación 7M3T.
6. En función de los resultados encontrados por la formulación 7M3T pensamos que su capacidad de degradación y de regeneración ósea por osteoinducción puede hacer que este recubrimiento pueda ser utilizado en pacientes de baja calidad ósea para inducir regeneración tanto por la

liberación de compuestos de silicio como por otras moléculas activas a dilucidar.

7. Además, la posibilidad de añadir GPTMS a la formulación 7M3T permite la adición de distintas biomoléculas en la red, que mejoren distintos aspectos del proceso de osteointegración en función de las necesidades de cada paciente, abre una ventana al futuro empleo de estos recubrimientos como vehículos de liberación controlada, suponiendo una ventaja competitiva personalizada en el proceso de osteointegración de los implantes dentales de titanio en beneficio de cada paciente.
8. Por tanto, como resultado de la evaluación de las formulaciones sol-gel de este trabajo, se elige el recubrimiento 7M3T como Prototipo Final.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abarrategui A, López Lacomba JL, Mónica Ramos V. Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhBMP-2 desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo. Universidad Complutense de Madrid; 2008.
2. Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2007; **28**:5058–5067.
3. Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, et al. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater Sci Eng R Rep* 2007; **58**:77–116.
4. Rodríguez-Piñeiro MI. Efectos de la diferencia electrolítica de la dieta sobre la homeostasis ácido-base y el metabolismo óseo en perros Beagle. Universidad de Santiago de Compostela; 2007.
5. Planell JA. Bone repair biomaterials. Cambridge: Woodhead Publishing; 2009.
6. Peñarrocha M, Oltra M, Sanchís M. *Implantología Oral*. Barcelona: Ars Médica; 2006.
7. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, Canto Pingarrón M del, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal Internet* 2006; **11**:47–51.
8. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001; **7**:259–264.
9. Zhang C. Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*. *J Orthop Surg* 2010; **5**:37.
10. Jones E, Yang X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury* 2011; **42**:562–568.
11. Bellido T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcif Tissue Int* 2014; **94**:25–34.
12. Olsen BR. Bone embryology. In: Favus MJ, ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research; 2006.
13. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2008; **4**:68–75.

14. Edwards JR, Mundy GR. Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* 2011; **7**:235–243.
15. Chambers TJ. The birth of the osteoclast: The birth of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* 2010; **1192**:19–26.
16. Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci Elite Ed* 2012; **4**:2302–2321.
17. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000; **21**:667–681.
18. Ferraris MEG de. *Histología y embriología bucodental*. Editorial Médica Panamericana; 1999.
19. George A, Veis A. Phosphorylated Proteins and Control over Apatite Nucleation, Crystal Growth, and Inhibition. *Chem Rev* 2008; **108**:4670–4693.
20. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009; **9**:61–71.
21. Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, et al. Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med* 2011; **15**:718–746.
22. Zohar R. Signals Between Cells and Matrix Mediate Bone Regeneration. In: *Bone regeneration*. Croatia: HaimTal; 2012:59–82.
23. Cobourne MT, Sharpe PT. Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Arch Oral Biol* 2003; **48**:1–14.
24. Kingsmill VJ. Post-extraction remodeling of the adult mandible. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; **10**:384–404.
25. Atwood DA. Postextraction changes in the adult mandible as illustrated by microradiographs of midsagittal sections and serial cephalometric roentgenograms. *J Prosthet Dent* 1963; **13**:810–824.
26. Moreno CS. Tratamiento del alvéolo post-extracción. Revisión de la literatura actual. *Rev Esp Odontostomatológica Implant* 2009; **17**:7–17.
27. Longoria JAG, de la Garza DR, López AM. Injerto de tejido conectivo inmediato postextracción para corregir defectos vestibulares. Reporte de tres casos. *Rev Mex Periodontol* 2012; **3**:24–29.
28. S.E.I I. *Libro Blanco de la Implantología en España*. Madrid: Sociedad Española de Implantes; 2008.

29. Chen F-M, Zhang J, Zhang M, An Y, Chen F, Wu Z-F. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials* 2010; **31**:7892–7927.
30. Tallgren A. The reduction in face height of edentulous and partially edentulous subjects during long-term denture wear. A longitudinal roentgenographic cephalometric study. *Acta Odontol Scand* 1966; **24**:195–239.
31. Pietrokovski J. The bony residual ridge in man. *J Prosthet Dent* 1975; **34**:456–462.
32. Buser D. Titanium for Dental Applications (II): Implants with Roughened Surfaces. In: *Titanium in Medicine. Vol I. Engineering Materials*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH; 2001:875–888.
33. Vlacic-Zischke J, Hamlet SM, Friis T, Tonetti MS, Ivanovski S. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGF β /BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials* 2011; **32**:665–671.
34. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Cheng A, et al. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomater* 2013; **9**:6268–6277.
35. Freese HL, Volas MG, Wood JR. Metallurgy and Technological Properties of Titanium and Titanium Alloys. In: *Titanium in Medicine. Vol I. Engineering Materials*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH; 2001:25–51.
36. Morales J, Pereira C. Biocompatibilidad. In: Sastre R, de Aza S, San Román J, eds. *Biomateriales*. Faenza, R.A., Italia: Faenza Editrice Iberica S.L.; 2004:522.
37. Spiekermann H, Donath K, Jovanovic S, Richter J, Nevascués Benlloch I. *Atlas de implantología*. Barcelona: Masson; 1995.
38. Ratner BD. A Perspective on Titanium Biocompatibility. In: *Titanium in Medicine. Vol I. Engineering Materials*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH; 2001:1–12.
39. Williams DF. Titanium for Medical Applications. In: *Titanium in Medicine. Vol I. Engineering Materials*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH; 2001:13–24.
40. Disegi J. *Implant Materials. Unalloyed Titanium*. 6th ed. Pennsylvania: Synthes; 2008.
41. Oldani C, Dominguez A. Titanium as a Biomaterial for Implants. In: Fokter SK, ed. *Recent Advances in Arthroplasty*. InTech; 2012:149–162.

42. Lausmaa J. Mechanical, Thermal, Chemical and Electrochemical Surface Treatment of Titanium. In: *Titanium in Medicine. Engineering Materials*. Springer Berlin Heidelberg; 2001:231–266.
43. Vallet-Regí M, Munuera L. *Biomateriales: Aquí y ahora*. Madrid: Dykinson; 2000.
44. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 2010; **31**:1465–1485.
45. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007; **23**:844–854.
46. Anil S, Anand PS, Alghamdi H, Jansen JA. Dental implant surface enhancement and osseointegration. In: *Implant Dentistry—A Rapidly Evolving Practice*. Rijeka, InTech.; 2011:86–90.
47. Albrektsson T, Brånemark PI, Eriksson A, Lindström J. The preformed autologous bone graft. An experimental study in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1978; **12**:215–223.
48. Clark PA. Modulation of bone ingrowth of rabbit femur titanium implants by in vivo axial micromechanical loading. *J Appl Physiol* 2005; **98**:1922–1929.
49. Lu C, Meinberg E, Marcucio R, Miclau T. Fracture Repair and Bone Grafting. In: Flynn JM, ed. *Orthopaedic Knowledge Update 10*. Rosemont, IL: AAOS eBooks; 2011:11–21.
50. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; **150**:893–899.
51. Urist MR. Bone transplants and implants. In: Urist MR, ed. *Fundamentals and Clinical Bone Physiology*. Philadelphia: JB Lippincott; 1980:pp 331–368.
52. Hench LL, Allen WC, Paschall HA, Piotrowski G. An investigation of bonding mechanisms at the interface of a prosthetic material. Gainesville, Fla: University of Florida; 1973.
53. Kienapfel H, Sprey C, Wilke A, Griss P. Implant fixation by bone ingrowth. *J Arthroplasty* 1999; **14**:355–368.
54. Leckholm U, Zarb G. Patient selection and preparation. In: *Tissue-Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence; 1985:199–210.
55. Beganskiene A, Raudonis R, Jokhadar SZ, Batista U, Kareiva A. Modified sol-gel coatings for biotechnological applications. *J Phys Conf Ser* 2007; **93**:012050.

56. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003; **67**:932–949.
57. Osborn J, Newesely H. Dynamic aspects of the implant-bone interface. In: Heimke G, European Society for Biomaterials, eds. *Dental implants: materials and systems*. München: Hanser; 1980:132.
58. Davies JE, Mendes VC, Ko JCH, Ajami E. Topographic scale-range synergy at the functional bone/implant interface. *Biomaterials* 2014; **35**:25–35.
59. Büchter A, Wiechmann D, Gaertner C, et al. Load-related bone modelling at the interface of orthodontic micro-implants. *Clin Oral Implants Res* 2006; **17**:714–722.
60. Serra G, Morais LS, Elias CN, et al. Sequential bone healing of immediately loaded mini-implants: histomorphometric and fluorescence analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010; **137**:80–90.
61. Gao S-S, Zhang Y-R, Zhu Z-L, Yu H-Y. Micromotions and combined damages at the dental implant/bone interface. *Int J Oral Sci* 2013; **4**:182–188.
62. Pilliar R. Implant Surface Design for Development and Maintenance of Osseointegration. In: *Bio-Implant Interface*. Boca Raton, Fla.: CRC Press; 2003:43–58.
63. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop* 1981; **52**:155–170.
64. Puleo D., Nanci A. Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials* 1999; **20**:2311–2321.
65. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; **29**:2941–2953.
66. Davies JE, Ajami E, Moineddin R, Mendes VC. The roles of different scale ranges of surface implant topography on the stability of the bone/implant interface. *Biomaterials* 2013; **34**:3535–3546.
67. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008; **20**:86–100.
68. Zareidoost A, Yousefpour M, Ghaseme B, Amanzadeh A. The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium. *J Mater Sci Mater Med* 2012; **23**:1479–1488.
69. Hansson S. Toward an Optimized Dental Implant Design. In: *Bio-Implant Interface*. Boca Raton, Fla.: CRC Press; 2003:29–42.

70. Wolff J. The Law of Bone Remodelling. Würburz: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH; 1986.
71. Salter RB. Textbook of Disorders and Injuries of the Musculoskeletal System. 3th ed. (Johnson EP, ed.). Baltimore, Md.: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
72. Torcasio A, Jahn K, Van Guyse M, et al. Trabecular Bone Adaptation to Low-Magnitude High-Frequency Loading in Microgravity. *PLoS ONE* E9352 2014; **9**:1–11.
73. Yoo Y-M, Kwag JH, Kim KH, Kim CH. Effects of Neuropeptides and Mechanical Loading on Bone Cell Resorption in Vitro. *Int J Mol Sci* 2014; **15**:5874–5883.
74. Ji J, Sun W, Wang W, Munyombwe T, Yang XB. The effect of mechanical loading on osteogenesis of human dental pulp stromal cells in a novel in vitro model. *Cell Tissue Res* 2014; **358**:123–33.
75. Benic GI, Mir-Mari J, Hämmerle CHF. Loading protocols for single-implant crowns: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2014; **29 Suppl**:222–238.
76. Pilliar RM, Lee JM, Maniopoulos C. Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. *Clin Orthop* 1986; **208**:108–113.
77. Szmukler-Moncler S, Salama H, Reingewirtz Y, Dubruille JH. Timing of loading and effect of micromotion on bone–dental implant interface: Review of experimental literature. *J Biomed Mater Res* 1998; **43**:192–203.
78. Futami T, Fujii N, Ohnishi H, et al. Tissue Response to Titanium Implants in the Rat Maxilla: Ultrastructural and Histochemical Observations of the Bone-Titanium Interface. *J Periodontol* 2000; **71**:287–298.
79. Baqain ZH, Moqbel WY, Sawair FA. Early dental implant failure: risk factors. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2012; **50**:239–243.
80. Cardaropoli G, Lekholm U, Wennström JL. Tissue alterations at implant-supported single-tooth replacements: a 1-year prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res* 2006; **17**:165–171.
81. Fadini GP. A reappraisal of the role of circulating (progenitor) cells in the pathobiology of diabetic complications. *Diabetologia* 2014; **57**:4–15.
82. Razzouk S, Sarkis R. Smoking and diabetes. Epigenetics involvement in osseointegration. *N Y State Dent J* 2013; **79**:27–30.
83. Cotter AG, Mallon PWG. The effects of untreated and treated HIV infection on bone disease. *Curr Opin HIV AIDS* 2014; **9**:17–26.

84. Castronuovo D, Cacopardo B, Pinzone MR, et al. Bone disease in the setting of HIV infection: update and review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; **17**:2413–2419.
85. Chandra A, Lan S, Zhu J, et al. PTH prevents the adverse effects of focal radiation on bone architecture in young rats. *Bone* 2013; **55**:449–457.
86. Keenawinna L, Oest ME, Mann KA, Spadaro J, Damron TA. Zoledronic acid prevents loss of trabecular bone after focal irradiation in mice. *Radiat Res* 2013; **180**:89–99.
87. Tanaka H, Tanabe N, Kawato T, et al. Nicotine Affects Bone Resorption and Suppresses the Expression of Cathepsin K, MMP-9 and Vacuolar-Type H⁺-ATPase d2 and Actin Organization in Osteoclasts. *PLoS ONE* 2013; **8**:1–12.
88. Brockmann F, Kramer M, Bornhauser M, Ehninger G, Holig K. Efficacy and Side Effects of Granulocyte Collection in Healthy Donors. *Transfus Med Hemotherapy* 2013; **40**:258–264.
89. Abate M, Vanni D, Pantalone A, Salini V. Cigarette smoking and musculoskeletal disorders. *Muscles Ligaments Tendons J* 2013; **3**:63–69.
90. Takamiya AS, Goiato MC, Filho HG. Effect of smoking on the survival of dental implants. *Biomed Pap* 2014; **158**:650–653.
91. Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater* 2013; **9**:4457–4486.
92. Hernández Escolano M. Desarrollo de recubrimientos híbridos osteoinductores para implantes dentales. Valencia, Spain: Universidad Politécnica de Valencia; 2012.
93. Piveteau L-D. Sol-Gel Coatings on Titanium. In: *Titanium in Medicine. Vol I. Engineering Materials*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH; 2001:267–282.
94. Hernández-Escolano M, Juan-Díaz MJ, Martínez-Ibáñez M, Suay J, Goñi I, Gurruchaga M. Synthesis of hybrid sol-gel materials and their biological evaluation with human mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med* 2013; **24**:1491–1499.
95. Dashnyam K, Perez R, Lee E-J, et al. Hybrid scaffolds of gelatin-siloxane releasing stromal derived factor-1 effective for cell recruitment. *J Biomed Mater Res A* 2014:1859–67.
96. Smitha S, Shajesh P, Mukundan P, Nair TDR, Warriar KGK. Synthesis of biocompatible hydrophobic silica-gelatin nano-hybrid by sol-gel process. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; **55**:38–43.

97. Carlisle EM. Silicon as an Essential Trace Element in Animal Nutrition. In: Evered D, O'Connor M, eds. Ciba Foundation Symposium 121 - Silicon Biochemistry. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.; 2007:123–139.
98. Anderson SI, Downes S, Perry CC, Caballero AM. Evaluation of the osteoblast response to a silica gel in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 1998; **9**:731–735.
99. Wiens M, Wang X, Schloßmacher U, et al. Osteogenic Potential of Biosilica on Human Osteoblast-Like (SaOS-2) Cells. *Calcif Tissue Int* 2010; **87**:513–524.
100. Camiré CL, Jegou Saint-Jean S, Mochales C, et al. Material characterization and in vivo behavior of silicon substituted α -tricalcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; **76B**:424–431.
101. Reffitt D., Ogston N, Jugdaohsingh R, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 2003; **32**:127–135.
102. Sun H, Wu C, Dai K, Chang J, Tang T. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. *Biomaterials* 2006; **27**:5651–5657.
103. Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011; **32**:2757–2774.
104. Gao T, Aro HT, Ylänen H, Vuorio E. Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Saos-2 osteoblasts in vitro. *Biomaterials* 2001; **22**:1475–1483.
105. Maehira F, Iinuma Y, Eguchi Y, Miyagi I, Teruya S. Effects of soluble silicon compound and deep-sea water on biochemical and mechanical properties of bone and the related gene expression in mice. *J Bone Miner Metab* 2008; **26**:446–455.
106. Han P, Wu C, Xiao Y. The effect of silicate ions on proliferation, osteogenic differentiation and cell signalling pathways (WNT and SHH) of bone marrow stromal cells. *Biomater Sci* 2013; **1**:379.
107. Wiens M, Wang X, Schröder HC, et al. The role of biosilica in the osteoprotegerin/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2010; **31**:7716–7725.
108. Tsuru K, Ohtsuki C, Osaka A, Iwamoto T, Mackenzie JD. Bioactivity of sol-gel derived organically modified silicates. Part I: In vitro examination. *J Mater Sci Mater Med* 1997; **8**:157–161.

109. Clark AE, Pantano CG, Hench LL. Auger Spectroscopic Analysis of Bioglass Corrosion Films. *J Am Ceram Soc* 1976; **59**:37–39.
110. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991; **74**:1487–1510.
111. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006; **27**:2907–2915.
112. Tsuru K, Shirotsaki Y, Hayakawa S, Osaka A. Sol-gel-derived silicate nano-hybrids for biomedical applications. *Biol Pharm Bull* 2013; **36**:1683–1687.
113. Wang X, Schröder HC, Wiens M, Ushijima H, Müller WE. Bio-silica and bio-polyphosphate: applications in biomedicine (bone formation). *Curr Opin Biotechnol* 2012; **23**:570–578.
114. Mahony O, Tsigkou O, Ionescu C, et al. Silica-Gelatin Hybrids with Tailorable Degradation and Mechanical Properties for Tissue Regeneration. *Adv Funct Mater* 2010; **20**:3835–3845.
115. Radin S, Chen T, Ducheyne P. The controlled release of drugs from emulsified, sol gel processed silica microspheres. *Biomaterials* 2009; **30**:850–858.
116. Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and β -tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2005; **26**:4856–4865.
117. Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010; **26**:397–419.
118. Katagiri Y. All Six Modules of the Gelatin-binding Domain of Fibronectin Are Required for Full Affinity. *J Biol Chem* 2003; **278**:11897–11902.
119. Erat MC, Sladek B, Campbell ID, Vakonakis I. Structural Analysis of Collagen Type I Interactions with Human Fibronectin Reveals a Cooperative Binding Mode. *J Biol Chem* 2013; **288**:17441–17450.
120. Leiss M, Beckmann K, Girós A, Costell M, Fässler R. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr Opin Cell Biol* 2008; **20**:502–507.
121. González-García C, Sousa SR, Moratal D, Rico P, Salmerón-Sánchez M. Effect of nanoscale topography on fibronectin adsorption, focal adhesion size and matrix organisation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; **77**:181–190.
122. Salmerón-Sánchez M, Rico P, Moratal D, Lee TT, Schwarzbauer JE, García AJ. Role of material-driven fibronectin fibrillogenesis in cell differentiation. *Biomaterials* 2011; **32**:2099–2105.

123. Krammer A, Craig D, Thomas WE, Schulten K, Vogel V. A structural model for force regulated integrin binding to fibronectin's RGD-synergy site. *Matrix Biol* 2002; **21**:139–147.
124. Ren L, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A. Synthesis and characterization of gelatin-siloxane hybrids derived through sol-gel procedure. *J Sol-Gel Sci Technol* 2001; **21**:115–121.
125. Ren L, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A. Novel approach to fabricate porous gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2002; **23**:4765–4773.
126. Ren L, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A. Sol-gel preparation and in vitro deposition of apatite on porous gelatin-siloxane hybrids. *J Non-Cryst Solids* 2001; **285**:116–122.
127. Ren L, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A. In vitro Evaluation of Osteoblast Response to Sol-Gel Derived Gelatin-Siloxane Hybrids. *J Sol-Gel Sci Technol* 2003; **26**:1137–1140.
128. Ren L, Osaka A, Yu B, et al. Bioactive Gelatin-Siloxane Hybrids as Tissue Engineering Scaffold. *Solid State Phenom* 2006; **111**:13–18.
129. Tsuru K, Robertson Z, Annaz B, et al. Sol-Gel Synthesis and In Vitro Cell Compatibility Analysis of Silicate-Containing Biodegradable Hybrid Gels. *Key Eng Mater* 2008; **361-363**:447–450.
130. Lei B, Shin K-H, Koh Y-H, Kim H-E. Porous gelatin-siloxane hybrid scaffolds with biomimetic structure and properties for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2014:n/a–n/a.
131. Chiu C-K, Ferreira J, Luo T-JM, Geng H, Lin F-C, Ko C-C. Direct Scaffolding of Biomimetic Hydroxyapatite-gelatin Nanocomposites using Aminosilane Cross-linker for Bone Regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2012; **23**:2115–2126.
132. Yu B, Chen S, Shi W, Ge D, Ren L, Zhang Q. Synthesis of bioactive gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering and evaluation of its drug release behaviors in vitro. *J Wuhan Univ Technol Mater Sci Ed* 2005; **20**:105–107.
133. Wang Z-Y, Zhao Y, Ren L, et al. Novel gelatin-siloxane nanoparticles decorated by Tat peptide as vectors for gene therapy. *Nanotechnology* 2008; **19**:445103.
134. Tian X-H, Wang Z-G, Meng H, et al. Tat peptide-decorated gelatin-siloxane nanoparticles for delivery of CGRP transgene in treatment of cerebral vasospasm. *Int J Nanomedicine* 2013; **8**:865–876.
135. Zhang Q-Y, Wang Z-Y, Wen F, et al. Gelatin-siloxane nanoparticles to deliver nitric oxide for vascular cell regulation: Synthesis, cytocompatibility, and cellular responses. *J Biomed Mater Res A* 2014.

136. Hussaini A, Martin J. Preventing infection after hip and knee replacements. Simple practices improve care while reducing costs. *Healthc Exec* 2013; **28**:68–70.
137. Bozic KJ, Grosso LM, Lin Z, et al. Variation in hospital-level risk-standardized complication rates following elective primary total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2014; **96**:640–647.
138. Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: treatment of perimplantitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; **18**:CD004970.
139. Böttcher H, Slowik P, Süß W. Sol-Gel Carrier Systems for Controlled Drug Delivery. *J Sol-Gel Sci Technol* 1998; **13**:277–281.
140. Böttcher H. Bioactive Sol-Gel Coatings. *J Für Prakt Chem* 2000; **342**:427–436.
141. Radin S, Ducheyne P, Kamplain T, Tan BH. Silica sol-gel for the controlled release of antibiotics. I. Synthesis, characterization, and in vitro release. *J Biomed Mater Res* 2001; **57**:313–320.
142. Radin S, El-Bassouini G, Vresilovic EJ, Schepers E, Ducheyne P. In vivo tissue response to resorbable silica xerogels as controlled-release materials. *Biomaterials* 2005; **26**:1043–1052.
143. Radin S, Ducheyne P. Controlled release of vancomycin from thin sol–gel films on titanium alloy fracture plate material. *Biomaterials* 2007; **28**:1721–1729.
144. Böttcher H, Jagota C, Trepte J, Kallies KH, Haufe H. Sol-gel composite films with controlled release of biocides. *Off J Control Release Soc* 1999; **60**:57–65.
145. Marycz K, Śmieszek A, Grzesiak J, Donesz-Sikorska A, Krzak-Roś J. Application of bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells for testing the biocompatibility of metal-based biomaterials functionalized with ascorbic acid. *Biomed Mater Bristol Engl* 2013; **8**:065004.
146. Donesz-Sikorska A, Grzesiak J, Smieszeka A, Krzak J, Marycz K. The influence of sol-gel-derived silica coatings functionalized with betamethasone on adipose-derived stem cells (ASCs). *J Biomater Appl* 2014:465–76.
147. Catauro M, Raucci MG, De Gaetano F, Marotta A. Antibacterial and bioactive silver-containing $\text{Na}_2\text{O} \times \text{CaO} \times 2\text{SiO}_2$ glass prepared by sol-gel method. *J Mater Sci Mater Med* 2004; **15**:831–837.
148. Catauro M, Raucci MG, De Gaetano F, Buri A, Marotta A, Ambrosio L. Sol-gel synthesis, structure and bioactivity of polycaprolactone/ $\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ hybrid material. *J Mater Sci Mater Med* 2004; **15**:991–995.

149. Catauro M, Raucci M g., de Marco D, Ambrosio L. Release kinetics of ampicillin, characterization and bioactivity of TiO₂/PCL hybrid materials synthesized by sol-gel processing. *J Biomed Mater Res A* 2006; **77A**:340–350.
150. Catauro M, Raucci MG, Convertito C, Melisi D, Rimoli MG. Characterization, bioactivity and ampicillin release kinetics of TiO₂ and TiO₂SiO₂ synthesized by sol-gel processing. *J Mater Sci Mater Med* 2006; **17**:413–420.
151. Catauro M, Raucci MG, Ausanio G, Ambrosio L. Sol-gel synthesis, characterization and bioactivity of poly(ether-imide)/TiO₂ hybrid materials. *J Appl Biomater Biomech JABB* 2007; **5**:41–48.
152. Catauro M, Melisi D, Curcio A, Rimoli M g. Sol-gel processing of anti-inflammatory entrapment in silica, release kinetics, and bioactivity. *J Biomed Mater Res A* 2008; **87A**:843–849.
153. Catauro M, Verardi D, Melisi D, Belotti F, Mustarelli P. Novel sol-gel organic-inorganic hybrid materials for drug delivery. *J Appl Biomater Biomech JABB* 2010; **8**:42–51.
154. Catauro M, Bollino F. Anti-inflammatory entrapment in polycaprolactone/silica hybrid material prepared by sol-gel route, characterization, bioactivity and in vitro release behavior. *J Appl Biomater Funct Mater* 2013; **11**:e172–179.
155. Catauro M, Papale F, Roviello G, et al. Synthesis of SiO₂ and CaO rich calcium silicate systems via sol-gel process: Bioactivity, biocompatibility, and drug delivery tests. *J Biomed Mater Res A* 2014; **102**:3087–92.
156. Catauro M, Bollino F, Papale F. Synthesis of SiO₂ system via sol-gel process: Biocompatibility tests with a fibroblast strain and release kinetics. *J Biomed Mater Res A* 2014; **102**:1677–1680.
157. Catauro M, Bollino F, Papale F. Preparation, characterization, and biological properties of organic-inorganic nanocomposite coatings on titanium substrates prepared by sol-gel. *J Biomed Mater Res A* 2014; **102**:392–399.
158. Catauro M, Bollino F. Release kinetics of anti-inflammatory drug, and characterization and bioactivity of SiO₂+PCL hybrid material synthesized by sol-gel processing. *J Appl Biomater Funct Mater* 2014; **12**:218–27.
159. Catauro M, Bollino F, Papale F. Biocompatibility improvement of titanium implants by coating with hybrid materials synthesized by sol-gel technique. *J Biomed Mater Res A* 2014; **102**:4473–9.
160. Catauro M, Papale F, Bollino F, Gallicchio M, Pacifico S. Biological evaluation of zirconia/PEG hybrid materials synthesized via sol-gel technique. *Mater Sci Eng C* 2014; **40**:253–259.

161. Schmidt C, Ignatius AA, Claes LE. Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001; **54**:209–215.
162. Williams DF. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials* 2014; **35**:10009–10014.
163. Williams DF. *Definitions in biomaterials*. Amsterdam: Elsevier; 1987.
164. Morais JM, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Biomaterials/Tissue Interactions: Possible Solutions to Overcome Foreign Body Response. *AAPS J* 2010; **12**:188–196.
165. Shen Y, Redmond SL, Papadimitriou JM, et al. The biocompatibility of silk fibroin and acellular collagen scaffolds for tissue engineering in the ear. *Biomed Mater* 2014; **9**:015015.
166. Li DJ, Ohsaki K, Li K, et al. Thickness of fibrous capsule after implantation of hydroxyapatite in subcutaneous tissue in rats. *J Biomed Mater Res* 1999; **45**:322–326.
167. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res* 2001; **31**:81–110.
168. AENOR. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 1: Evaluación y ensayos mediante un proceso de gestión del riesgo. (UNE-EN ISO 10993-1:2009).
169. AENOR. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 3: Ensayos de genotoxicidad, carcinogenicidad y toxicidad para la reproducción (UNE-EN ISO 10993-2009).
170. AENOR. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro (UNE-EN ISO 10993-5; 2009).
171. AENOR. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 11: Ensayos de toxicidad sistémica (UNE-EN ISO 10993-11).
172. AENOR. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 6: Ensayos relativos a los efectos locales después de la implantación (UNE-EN ISO 10993-6:2009).
173. AENOR. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 16: Diseño del estudio toxicocinético de productos de degradación y sustancias lixiviables (UNE-EN ISO 10993-16).
174. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007; **13**:1–10.
175. Paul J. *Cell and Tissue Culture*. 5th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1975.

176. Mather JP, Roberts PE. Introduction to Cell and Tissue Culture - Theory and Technique. New York: Springer US; 1998.
177. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell* 2008; **2**:313–319.
178. Murray IR, West CC, Hardy WR, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2014; **71**:1353–1374.
179. Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol* 2009; **57**:318–323.
180. Eslaminejad MB, Faghihi F. Mesenchymal Stem Cell-Based Bone Engineering for Bone Regeneration. In: Eberli D, ed. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. InTech; 2011:602.
181. Ramires PA, Wennerberg A, Johansson CB, Cosentino F, Tundo S, Milella E. Biological behavior of sol-gel coated dental implants. *J Mater Sci Mater Med* 2003; **14**:539–545.
182. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 2003; **32**:127–135.
183. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 1992; **7**:683–692.
184. Ikarashi Y, Tsuchiya T, Toyoda K, et al. Tissue reaction end sensitivity to iron-chromium alloys. *Mater Trans* 2002; **43**:3065–3071.
185. MacNeill SR, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. *J Clin Periodontol* 1999; **26**:239–245.
186. Gil-Albarova J, Garrido-Lahiguera R, Salinas AJ, et al. The in vivo performance of a sol-gel glass and a glass-ceramic in the treatment of limited bone defects. *Biomaterials* 2004; **25**:4639–4645.
187. Ballarre J, Manjubala I, Schreiner WH, Orellano JC, Fratzi P, Ceré S. Improving the osteointegration and bone-implant interface by incorporation of bioactive particles in sol-gel coatings of stainless steel implants. *Acta Biomater* 2010; **6**:1601–1609.
188. Meseguer-Olmo L, Ros-Nicolás M, Vicente-Ortega V, et al. A bioactive sol-gel glass implant for in vivo gentamicin release. Experimental model in Rabbit. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 2006; **24**:454–460.

189. Mansur HS, Oréface RL, Vasconcelos WL, Lobato ZP, Machado LJC. Biomaterial with chemically engineered surface for protein immobilization. *J Mater Sci Mater Med* 2005; **16**:333–340.
190. Gerritsen M, Kros A, Sprakel V, Lutterman JA, Nolte RJM, Jansen JA. Biocompatibility evaluation of sol–gel coatings for subcutaneously implantable glucose sensors. *Biomaterials* 2000; **21**:71–78.
191. Bernhardt R, Kuhlisch E, Schulz MC, Eckelt U, Stadlinger B. Comparison of bone-implant contact and bone-implant volume between 2D-histological sections and 3D-SR μ CT slices. *Eur Cell Mater* 2012; **23**:237.
192. Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J* 2012; **9**:111–118.
193. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng* 1998; **8**:1–9.
194. Monfoulet L, Rabier B, Chassande O, Fricain J-C. Drilled Hole Defects in Mouse Femur as Models of Intramembranous Cortical and Cancellous Bone Regeneration. *Calcif Tissue Int* 2010; **86**:72–81.
195. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992; **7**:62–71.
196. Naito Y, Jimbo R, Bryington MS, et al. The Influence of 1 α .25-Dihydroxyvitamin D3 Coating on Implant Osseointegration in the Rabbit Tibia. *J Oral Maxillofac Res* 2014; **5**:e3.
197. Ito K, Nanba K, Nishida T, Sato H, Murai S. Comparison of osseointegration between hydroxyapatite-coated and uncoated threaded titanium dental implants placed into surgically-created bone defect in rabbit tibia. *J Oral Sci* 1998; **40**:37–41.
198. Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg* 1997; **55**:351–63.
199. Breiding K, Jimbo R, Hayashi M, Xue Y, Mustafa K, Andersson M. The Effect of Hydroxyapatite Nanocrystals on Osseointegration of Titanium Implants: An In Vivo Rabbit Study. *Int J Dent* 2014; **2014**:9.
200. Nalin L. The rabbit as an animal model in dental implant research. Uppsala: SLU University; 2013.
201. Tiesler V, Cucina A, Streeter M. Manual de histomorfología en hueso no descalcificado. Mérida: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán; 2006.

202. Peris J, Prat J, Comin M, Dejoz R, Roger I, Vera P. Técnica histológica para la inclusión en metil-metacrilato de muestras óseas no descalcificadas. *Rev Esp Cir Osteoart* 1993; **28**:231–238.
203. Cano-Sanchez J, Campo-Trapero J, Gonzalo-Lafuente JC, Moreno-López LA, Bascones-Martínez A. Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature. *Oral Med Pathol* 2005; **10**:74–87.
204. Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002; **30**:5–7.
205. McMillan PJ, Riggs ML, Bogle GC, Crigger M. Variables that influence the relationship between osseointegration and bone adjacent to an implant. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; **15**:654–661.
206. Nkenke E, Lehner B, Weinzierl K, et al. Bone contact, growth, and density around immediately loaded implants in the mandible of mini pigs. *Clin Oral Implants Res* 2003; **14**:312–321.
207. Radin SR, Ducheyne P. Effect of bioactive ceramic composition and structure on in vitro behavior. III. Porous versus dense ceramics. *J Biomed Mater Res* 1994; **28**:1303–1309.
208. Radin S, Ducheyne P. Effect of serum proteins on solution-induced surface transformations of bioactive ceramics. *J Biomed Mater Res* 1996; **30**:273–279.
209. Radin S, Ducheyne P, Rothman B, Conti A. The effect of in vitro modeling conditions on the surface reactions of bioactive glass. *J Biomed Mater Res* 1997; **37**:363–375.
210. Radin S, Campbell JT, Ducheyne P, Cuckler JM. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials* 1997; **18**:777–782.
211. Radin S, Ducheyne P, Ayyaswamy PS, Gao H. Surface transformation of bioactive glass in bioreactors simulating microgravity conditions. Part I: experimental study. *Biotechnol Bioeng* 2001; **75**:369–378.
212. Radin S, Ducheyne P, Falaize S, Hammond A. In vitro transformation of bioactive glass granules into Ca-P shells. *J Biomed Mater Res* 2000; **49**:264–272.
213. Radin S, Reilly G, Bhargava G, Leboy PS, Ducheyne P. Osteogenic effects of bioactive glass on bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* 2005; **73**:21–29.
214. Radin S, Falaize S, Lee MH, Ducheyne P. In vitro bioactivity and degradation behavior of silica xerogels intended as controlled release materials. *Biomaterials* 2002; **23**:3113–3122.

215. Radin S, Bhattacharyya S, Ducheyne P. Nanostructural control of the release of macromolecules from silica sol–gels. *Acta Biomater* 2013; **9**:7987–7995.
216. Radin S, Chen T, Ducheyne P. The controlled release of drugs from emulsified, sol gel processed silica microspheres. *Biomaterials* 2009; **30**:850–858.
217. He G, Guo B, Wang H, et al. Surface characterization and osteoblast response to a functionally graded hydroxyapatite/fluoro-hydroxyapatite/titanium oxide coating on titanium surface by sol-gel method. *Cell Prolif* 2014; **47**:258–266.
218. Juan-Díaz M. Desarrollo de recubrimientos híbridos bioactivos para implantes dentales. San Sebastián, Spain: Universidad del País Vasco; 2013.
219. Hernández-Escolano M, Juan-Díaz M, Martínez-Ibáñez M, et al. The design and characterisation of sol–gel coatings for the controlled-release of active molecules. *J Sol-Gel Sci Technol* 2012; **64**:442–451.
220. Hernández-Escolano M, Ramis X, Jiménez-Morales A, Juan-Díaz M, Suay J. Study of the thermal degradation of bioactive sol–gel coatings for the optimization of its curing process. *J Therm Anal Calorim* 2011; **107**:499–508.
221. Zolkov C, Avnir D, Armon R. Tissue-derived cell growth on hybrid sol-gel films. *J Mater Chem* 2004; **14**:2200–2205.
222. Reiner T, Kababya S, Gotman I. Protein incorporation within Ti scaffold for bone ingrowth using Sol-gel SiO₂ as a slow release carrier. *J Mater Sci Mater Med* 2008; **19**:583–589.
223. Kowalski C. Dektak 6M Manual. Rev. A. Santa Barbara, CA: Digital Instruments Veeco Metrology Group; 2002.
224. Kokubo T, Kim H-M, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 2003; **24**:2161–2175.
225. Vallés A. P(EMA-co_HEA)/SiO₂ hybrid nanocomposites for guided dentin tissue regeneration: structure, characterization and bioactivity. Valencia, Spain: Universidad Politécnica de Valencia; 2008.
226. Kokubo T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* 1991; **12**:155–163.
227. Cüneyt Tas A. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids. *Biomaterials* 2000; **21**:1429–1438.
228. Cantini M, Rico P, Salmerón-Sánchez M. Fibronectin Fibrillogenesis at the Cell-Material Interface. In: Mano JF, ed. *Biomimetic Approaches for Biomaterials Development*. Germany: Wiley-VCH; 2012:189–210.

229. Anon. <http://www.cellmigration.org/science/index.shtml>.
230. Prin JL, González N, Villarroel H, Ramírez M, Gáscue BR de. El secado de punto crítico (spc) como técnica aplicada en la preparación de geles de poli(acrilamida-co-ácido acrílico) por microscopía electrónica de barrido. *Rev Latinoam Metal Mater* 2012; **5**:20–23.
231. Wiskott HWA, Cugnoni J, Scherrer SS, Ammann P, Botsis J, Belser UC. Bone reactions to controlled loading of endosseous implants: a pilot study. *Clin Oral Implants Res* 2008; **19**:1093–1102.
232. Seong W-J, Grami S, Jeong SC, Conrad HJ, Hodges JS. Comparison of push-in versus pull-out tests on bone-implant interfaces of rabbit tibia dental implant healing model. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013; **15**:460–469.
233. Lara-Sáez I. Evaluación biológica de nuevos recubrimientos sol-gel para implantes dentales de titanio. Valencia, Spain: Universidad Politécnica de Valencia; 2012.
234. Garcia LS. *Diagnostic Medical Parasitology*. 5a Ed. Washington, D.C: ASM Press; 2006.
235. Moreno A, Marcoval J. Granulomas a cuerpo extraño. In: Herrera E, Moreno A, Requena L, Rodríguez JL, eds. *Dermatopatología Correlacion Clinico Patologica*. 1ra Ed. Barcelona: Grupo Merarini; 2006:255–8.
236. López-Bravo A, Parra J, Jiménez J, San Román J. Análisis anatomopatológico de los biomateriales. In: Sastre R, De Aza S, San Román J, eds. *Biomateriales*. Faenza, R.A., Italia: Faenza Editrice Iberica S.L.; 2004:220–39.
237. Wierzechos J, Falcioni T, Kiciak A, et al. Advances in the ultrastructural study of the implant–bone interface by backscattered electron imaging. *Micron* 2008; **39**:1363–1370.
238. Saltzman WM. Cell interactions with Polymers. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J, eds. *Principles of Tissue Engineering*. 3er Ed. New York: Oxford University Accademic Press; 2004:221–231.
239. Miettinen JA, Salonen RJ, Ylitalo K, et al. The effect of bone marrow microenvironment on the functional properties of the therapeutic bone marrow-derived cells in patients with acute myocardial infarction. *J Transl Med* 2012; **10**:66.
240. Bird RM, Evans JD, Becker W the technical assistance of L. The effect of pH on the metabolism of rabbit bone marrow. *J Biol Chem* 1949; **178**:289–300.
241. Evans JD, Bird RM, Becker W the technical assistance of MS and L. Metabolism of rabbit bone marrow in vitro in Ringer-bicarbonate medium containing no added glucose. *J Biol Chem* 1949; **181**:357–365.

242. Evans JD, Seip W the technical assistance of M. Pyruvate metabolism of normal rabbit bone marrow in vitro. *J Biol Chem* 1950; **187**:273–280.
243. Davies JE, Baldan N. Scanning electron microscopy of the bone-bioactive implant interface. *J Biomed Mater Res* 1997; **36**:429–440.
244. Ravaglioli A, Krajewski A, Biasini V, Martinetti R, Mangano C, Venini G. Interface between hydroxyapatite and mandibular human bone tissue. *Biomaterials* 1992; **13**:162–167.
245. Dietz AA, Steinberg B. Chemistry of bone marrow: VII. Composition of rabbit bone marrow in experimental hemolytic anemia. *Arch Biochem Biophys* 1953; **45**:1–9.
246. Dietz AA, Steinberg B. Chemistry of bone marrow: VIII. Composition of rabbit bone marrow in inanition. *Arch Biochem Biophys* 1953; **45**:10–20.
247. Anon. <http://www.reading.ac.uk/cellmigration/migration.htm>.
248. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Cytoskeleton. In: Anderson M, Granum S, eds. *Molecular Biology of the Cell*. 5th Ed. New York: Garland Science; 2008:965–1052.
249. Ananthakrishnan R. The Forces Behind Cell Movement. *Int J Biol Sci* 2007; **3**:303–317.
250. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; **279**:509–514.
251. Yamamichi N, Pugdee K, Chang W-J, et al. Gene expression monitoring in osteoblasts on titanium coated with fibronectin-derived peptide. *Dent Mater J* 2008; **27**:744–750.
252. Böhner M, Lemaître J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials* 2009; **30**:2175–2179.
253. Byers BA, Pavlath GK, Murphy TJ, Karsenty G, García AJ. Cell-Type-Dependent Up-Regulation of In Vitro Mineralization After Overexpression of the Osteoblast-Specific Transcription Factor Runx2/Cbfa1. *J Bone Miner Res* 2002; **17**:1931–1944.
254. Jadlowiec J, Koch H, Zhang X, Campbell PG, Seyedain M, Sfeir C. Phosphorylation regulates the gene expression and differentiation of NIH3T3, MC3T3-E1, and human mesenchymal stem cells via the integrin/MAPK signaling pathway. *J Biol Chem* 2004; **279**:53323–53330.
255. Fontana F, Rocchietta I, Addis A, Schupbach P, Zanotti G, Simion M. Effects of a calcium phosphate coating on the osseointegration of endosseous implants in a rabbit model. *Clin Oral Implants Res* 2011; **22**:760–766.

256. Rasmusson L, Meredith N, Kahnberg K-E, Sennerby L. Stability assessments and histology of titanium implants placed simultaneously with autogenous onlay bone in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998; **27**:229–235.
257. Fröjd V, Franke-Stenport V, Meirelles L, Wennerberg A. Increased bone contact to a calcium-incorporated oxidized commercially pure titanium implant: an in-vivo study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; **37**:561–566.
258. Ivanoff C-J, Sennerby L, Johansson C, Rangert B, Lekholm U. Influence of implant diameters on the integration of screw implants: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997; **26**:141–148.
259. Søballe K, Hansen ES, B-Rasmussen H, Jørgensen PH, Bünger C. Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatite-coated implants during stable and unstable mechanical conditions. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 1992; **10**:285–299.
260. Gan L, Wang J, Tache A, Valiquette N, Deporter D, Pilliar R. Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. Part II: Short-term in vivo studies. *Biomaterials* 2004; **25**:5313–5321.
261. Li P, de Groot K. Calcium phosphate formation within sol-gel prepared titania in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res* 1993; **27**:1495–1500.

ANEXO 1

Tablas del estudio estadístico de los resultados de la *Fase de Caracterización I*

Proliferación celular (HISTOCELL), estudio por periodos

Test of Homogeneity of Variances

Proliferación

Periodo	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0	4,052	9	110	,000
1	6,722	9	110	,000
7	6,943	9	110	,000
14	5,649	9	110	,000

ANOVA

Proliferación

Periodo		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
0	Between Groups	,088	9	,010	71,621	,000
	Within Groups	,015	110	,000		
	Total	,103	119			
1	Between Groups	,210	9	,023	194,076	,000
	Within Groups	,013	110	,000		
	Total	,224	119			
7	Between Groups	1,202	9	,134	234,055	,000
	Within Groups	,063	110	,001		
	Total	1,265	119			
14	Between Groups	,446	9	,050	102,876	,000
	Within Groups	,053	110	,000		
	Total	,499	119			

Kruskal-Wallis Test

Material Control-7M3T

Periodo 0 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,333
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 7M3T-8M2T

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	9,599
df	1
Asymp. Sig.	,002

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8M2T-9M1T

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	14,151
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
--	---------------

Periodo 1 día

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	16,383
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	12,021
df	1
Asymp. Sig.	,001

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	1,486
df	1
Asymp. Sig.	,223

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
--	---------------

Chi-Square	1,701
df	1
Asymp. Sig.	,192

Material 9M1T-2V8G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	14,407
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	15,884
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 2V8G-5V5G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	13,737
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	1,920
df	1
Asymp. Sig.	,166

Material 5V5G-8V2G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,803
df	1
Asymp. Sig.	,370

Chi-Square	16,390
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,424
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,340
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	2,813
df	1
Asymp. Sig.	,093

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	6,765
df	1
Asymp. Sig.	,009

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,371
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	3,865
df	1
Asymp. Sig.	,049

Periodo = 14Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,280
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8V2G-2M8G**Periodo = 0**Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,363
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,003
df	1
Asymp. Sig.	,954

Material 2M8G-5M5G**Periodo = 0**Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	1,923
df	1
Asymp. Sig.	,166

Periodo = 14Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	9,927
df	1
Asymp. Sig.	,002

Material 5M5G-8M2G**Periodo = 0**Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	2,443
df	1

Periodo = 1Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	1,846
df	1

Asymp. Sig.	,118
-------------	------

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material Control-8M2T

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,340
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material Control-9M1T

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,355
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material Control-2V8G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,363

Asymp. Sig.	,174
-------------	------

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	9,918
df	1
Asymp. Sig.	,002

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,318
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,401
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,333
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,318

df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material Control-5V5G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material Control-8V2G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,333
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	5,340
df	1
Asymp. Sig.	,021

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	12,847
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	15,201
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,363
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,701
df	1
Asymp. Sig.	,402

Material Control-2M8G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	5,352
df	1
Asymp. Sig.	,021

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	16,348
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material Control-5M5G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,333
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material Control-8M2G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,288
df	1

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	13,886
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,101
df	1
Asymp. Sig.	,751

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	8,344
df	1
Asymp. Sig.	,004

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,270
df	1

Asymp. Sig.	,000
-------------	------

Material 7M3T-9M1T

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,054
df	1
Asymp. Sig.	,817

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 7M3T-2V8G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	6,774
df	1
Asymp. Sig.	,009

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,213
df	1
Asymp. Sig.	,644

Material 7M3T-5V5G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,565
df	1
Asymp. Sig.	,452

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
--	---------------

Asymp. Sig.	,603
-------------	------

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	16,684
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	12,042
df	1
Asymp. Sig.	,001

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
--	---------------

Chi-Square	5,205
df	1
Asymp. Sig.	,023

Material 7M3T-8V2G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	2,352
df	1
Asymp. Sig.	,125

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,101
df	1
Asymp. Sig.	,751

Material 7M3T-2M8G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 7M3T-5M5G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	7,066
df	1
Asymp. Sig.	,008

Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,165
df	1
Asymp. Sig.	,685

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	10,105
df	1
Asymp. Sig.	,001

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,318
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7**Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14**Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 7M3T-8M2G**Periodo = 0****Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	,334
df	1
Asymp. Sig.	,563

Periodo = 1**Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	14,983
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7**Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	,021
df	1
Asymp. Sig.	,885

Periodo = 14**Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8M2T-2V8G**Periodo = 0****Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	17,348
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1**Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	17,340
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7**Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14**Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8M2T-5V5G**Periodo = 0****Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	8,860
df	1

Periodo = 1**Test Statistics^{a,b,c}**

	Proliferación
Chi-Square	17,325
df	1

Asymp. Sig.	,003
-------------	------

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8M2T-8V2G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	4,960
df	1
Asymp. Sig.	,026

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8M2T-2M8G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8M2T-5M5G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
--	---------------

Asymp. Sig.	,000
-------------	------

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,386
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,318
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
--	---------------

Chi-Square	17,318
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8M2T-8M2G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	8,017
df	1
Asymp. Sig.	,005

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	16,818
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 9M1T-5V5G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	1,144
df	1
Asymp. Sig.	,285

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Chi-Square	17,348
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,318
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,409
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 9M1T-8V2G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	4,228
df	1
Asymp. Sig.	,040

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	15,898
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,470
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 9M1T-2M8G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,401
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 9M1T-5M5G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	15,029
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,310

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,432
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,340

df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 9M1T-8M2G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	2,174
df	1
Asymp. Sig.	,140

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	14,976
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 2V8G-8V2G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,340
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	1,142
df	1
Asymp. Sig.	,285

Material 2V8G-5M5G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,054
df	1
Asymp. Sig.	,817

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
--	---------------

df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,401
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,333
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,386
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	5,338
df	1
Asymp. Sig.	,021

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	16,891
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
--	---------------

Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 2V8G-8M2G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	1,933
df	1
Asymp. Sig.	,164

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	1,080
df	1
Asymp. Sig.	,299

Material 5V5G-2M8G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 5V5G-5M5G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	14,326
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Chi-Square	2,440
df	1
Asymp. Sig.	,118

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	13,259
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	1,544
df	1
Asymp. Sig.	,214

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,335
df	1
Asymp. Sig.	,563

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,280
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,333
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 5V5G-8M2G**Periodo = 0**Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	2,434
df	1
Asymp. Sig.	,119

Periodo = 7Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	5,333
df	1
Asymp. Sig.	,021

Material 8V2G-5M5G**Periodo = 0**Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8V2G-8M2G**Periodo = 0**Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	4,696
df	1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	5,208
df	1
Asymp. Sig.	,022

Periodo = 1Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	15,214
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	13,671
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 1Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,393
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	7,687
df	1
Asymp. Sig.	,006

Periodo = 1Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	15,267
df	1

Asymp. Sig.	,030
-------------	------

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,214
df	1
Asymp. Sig.	,644

Material 5V5G-8M2G

Periodo = 0

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

Asymp. Sig.	,000
-------------	------

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	1,205
df	1
Asymp. Sig.	,272

Periodo = 1

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14

Test Statistics^{a,b,c}

	Proliferación
Chi-Square	,521
df	1
Asymp. Sig.	,470

Proliferación celular (HISTOCELL), estudio por materiales

Recubrimiento evaluado = Control

Test of Homogeneity of Variances^a

Valores para ensayo de proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,517	3	44	,003

Recubrimiento evaluado = 2M8G

Test of Homogeneity of Variances^a

Valores para ensayo de proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8,754	3	43	,000

Recubrimiento evaluado = 5M5G

Test of Homogeneity of Variances^a

Valores para ensayo de proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6,140	3	43	,001

Recubrimiento evaluado = 8M2G

Test of Homogeneity of Variances^a

Valores para ensayo de proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6,629	3	44	,001

Recubrimiento evaluado = 7M3T

Test of Homogeneity of Variances^a

Valores para ensayo de proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,285	3	43	,836

ANOVA^a

Valores para ensayo de proliferación

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,034	3	,011	61,238	,000
Within	,008	43	,000		

Groups				
Total	,042	46		

Multiple Comparisons^a

Dependent Variable:Proliferación

(I) Periodo	(J) Periodo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LSD 0	1	,01950	,00754	,013	,0043	,0347
	7	-,03400	,00754	,000	-,0492	-,0188
	14	-,04117	,00754	,000	-,0564	-,0260
1	0	-,01950	,00754	,013	-,0347	-,0043
	7	-,05350	,00754	,000	-,0687	-,0383
	14	-,06067	,00754	,000	-,0759	-,0455
7	0	,03400	,00754	,000	,0188	,0492
	1	,05350	,00754	,000	,0383	,0687
	14	-,00717	,00754	,347	-,0224	,0080
14	0	,04117	,00754	,000	,0260	,0564
	1	,06067	,00754	,000	,0455	,0759
	7	,00717	,00754	,347	-,0080	,0224

Recubrimiento evaluado = 9M1T

Test of Homogeneity of Variances^a

Valores para ensayo de proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,597	3	44	,064

ANOVA^a

Valores para ensayo de proliferación

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,012	3	,004	69,521	,000
Within Groups	,003	44	,000		
Total	,015	47			

Multiple Comparisons^a

Dependent Variable:Proliferación

(I) Periodo	(J) Periodo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LSD 0	1	,04442	,00311	,000	,0382	,0507
	7	,02750	,00311	,000	,0212	,0338
	14	,02575	,00311	,000	,0195	,0320
1	0	-,04442	,00311	,000	-,0507	-,0382
	7	-,01692	,00311	,000	-,0232	-,0107
	14	-,01867	,00311	,000	-,0249	-,0124
7	0	-,02750	,00311	,000	-,0338	-,0212
	1	,01692	,00311	,000	,0107	,0232
	14	-,00175	,00311	,576	-,0080	,0045
14	0	-,02575	,00311	,000	-,0320	-,0195
	1	,01867	,00311	,000	,0124	,0249
	7	,00175	,00311	,576	-,0045	,0080

Recubrimiento evaluado = 8M2T

Test of Homogeneity of Variances^a

Valores para ensayo de proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,512	3	44	,003

Recubrimiento evaluado = 2V8G

Test of Homogeneity of Variances^a

Valores para ensayo de proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,344	3	44	,003

Recubrimiento evaluado = 5V5G

Test of Homogeneity of Variances^a

Valores para ensayo de proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.

Recubrimiento evaluado = 8V2G

Test of Homogeneity of Variances^a

Valores para ensayo de proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.

Kruskal-Wallis Test

Periodo 0-1 días

Control

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	8,355
df	1
Asymp. Sig.	,004

2M8G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	1,097
df	1
Asymp. Sig.	,295

5M5G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	1,018
df	1
Asymp. Sig.	,313

8M2G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	,564
df	1
Asymp. Sig.	,453

7M3T

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	8,178
df	1
Asymp. Sig.	,004

8M2T

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,333
df	1
Asymp. Sig.	,000

9M1T

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,432
df	1
Asymp. Sig.	,000

2V8G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	6,934
df	1
Asymp. Sig.	,008

5V5G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,303
df	1
Asymp. Sig.	,000

8V2G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	4,126
df	1
Asymp. Sig.	,042

Periodo 1-7 días

Control

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

2M8G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	16,516
df	1
Asymp. Sig.	,000

5M5G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	16,290
df	1
Asymp. Sig.	,000

8M2G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	1,921
df	1
Asymp. Sig.	,166

7M3T

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

8M2T

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

9M1T

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	16,469
df	1
Asymp. Sig.	,000

Sig.	
------	--

Sig.	
------	--

Sig.	
------	--

2V8G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	,054
df	1
Asymp. Sig.	,817

5V5G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	,053
df	1
Asymp. Sig.	,817

8V2G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	16,419
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 7- 14 días

Control

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

2M8G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

5M5G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	15,670
df	1
Asymp. Sig.	,000

8M2G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

7M3T

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	5,922
df	1
Asymp. Sig.	,015

8M2T

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	16,362
df	1
Asymp. Sig.	,000

9M1T

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	4,232
df	1
Asymp. Sig.	,040

2V8G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

5V5G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,280
df	1
Asymp. Sig.	,000

8V2G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	12,010
df	1
Asymp. Sig.	,001

Periodo 0-7 días

Control

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

2M8G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

5M5G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	15,670
df	1
Asymp. Sig.	,000

8M2G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	4,565
df	1
Asymp. Sig.	,033

7M3T**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	16,847
df	1
Asymp. Sig.	,000

8M2T**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	2,911
df	1
Asymp. Sig.	,088

9M1T**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	14,351
df	1
Asymp. Sig.	,000

2V8G**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	1,338
df	1
Asymp. Sig.	,247

5V5G**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

8V2G**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	12,836
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 0-14 días**Control****Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	15,454
df	1
Asymp. Sig.	,000

2M8G**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

5M5G**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

8M2G**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

7M3T**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	12,021
df	1
Asymp. Sig.	,001

8M2T**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	8,564
df	1
Asymp. Sig.	,003

9M1T**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,363
df	1
Asymp. Sig.	,000

2V8G**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,340
df	1
Asymp. Sig.	,000

5V5G**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

8V2G**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 1-14 días

Control

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	10,294
df	1
Asymp. Sig.	,001

2M8G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	16,508
df	1
Asymp. Sig.	,000

5M5G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,333
df	1
Asymp. Sig.	,000

8M2G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

7M3T

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	16,516
df	1
Asymp. Sig.	,000

8M2T

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

9M1T

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,439
df	1
Asymp. Sig.	,000

2V8G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

5V5G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

8V2G

Test Statistics ^{a,b,c}	
	Valores para ensayo de proliferación
Chi-Square	17,355
df	1
Asymp. Sig.	,000

Mineralización celular (HISTOCELL), estudio por materiales

T-Test

Recubrimiento evaluado = Control

Group Statistics^a

	Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mineralización	7	12	,0808	,03265	,00943
	14	12	,1313	,06353	,01834

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	4,632	,043	-2,445	22	,023	-,05042	,02062	-	-,00765
	Equal variances not assumed			-2,445	16,433	,026	-,05042	,02062	-	-,00680

Materiales implantados = 7M3T

Group Statistics^a

Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mineralización 7	12	,0828	,00482	,00139
14	12	,1497	,00936	,00270

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	11,298	,003	-21,981	22	,000	-,06683	,00304	-	-,06053
	Equal variances not assumed			-21,981	16,448	,000	-,06683	,00304	-	-,06040

Materiales implantados = 8M2T

Group Statistics^a

Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mineralización 7	12	,0588	,00736	,00212
14	12	,1149	,01430	,00413

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	11,429	,003	-12,081	22	,000	-,05608	,00464	-,06571	-,04646
	Equal variances not assumed			-12,081	16,445	,000	-,05608	,00464	-,06590	-,04626

Materiales implantados = 9M1T

Group Statistics^a

	Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mineralización	7	12	,0468	,00555	,00160
	14	12	,0896	,02697	,00779

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	22,961	,000	-5,389	22	,000	-,04283	,00795	-,05932	-,02635
	Equal variances not assumed			-5,389	11,928	,000	-,04283	,00795	-,06016	-,02550

Materiales implantados = 2V8G

Group Statistics^a

	Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mineralización	7	12	,1125	,01716	,00496
	14	12	,2382	,02431	,00702

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	2,338	,140	-14,629	22	,000	-,12567	,00859	-,14348	-,10785
	Equal variances not assumed			-14,629	19,786	,000	-,12567	,00859	-,14360	-,10774

Materiales implantados = 5V5G

Group Statistics^a

	Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mineralización	7	12	,0850	,01537	,00444
	14	12	,2987	,13173	,03803

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	62,876	,000	-5,581	22	,000	-,21367	,03828	-,29306	-,13427
	Equal variances not assumed			-5,581	11,299	,000	-,21367	,03828	-,29766	-,12967

Materiales implantados = 8V2G

Group Statistics^a

	Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mineralización	7	12	,1032	,01754	,00506
	14	12	,1228	,01802	,00520

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	,030	,863	-2,697	22	,013	-,01958	,00726	-,03464	-,00453
	Equal variances not assumed			-2,697	21,984	,013	-,01958	,00726	-,03464	-,00453

Materiales implantados = 2M8G

Group Statistics^a

Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mineralización 7	12	,0920	,01510	,00436
14	12	,2010	,03532	,01020

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	9,474	,006	-9,831	22	,000	-,10900	,01109	-,13199	-,08601
	Equal variances not assumed			-9,831	14,892	,000	-,10900	,01109	-,13265	-,08535

Materiales implantados = 5M5G

Group Statistics^a

Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mineralización 7	12	,0978	,03128	,00903
14	12	,1793	,04462	,01288

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	3,073	,094	-5,181	22	,000	-,08150	,01573	-,11412	-,04888
	Equal variances not assumed			-5,181	19,708	,000	-,08150	,01573	-,11434	-,04866

Materiales implantados = 8M2G

Group Statistics^a

Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
7	12	,0698	,01516	,00438
14	12	,1808	,03934	,01136

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	26,639	,000	-9,114	22	,000	-,11092	,01217	-,13616	-,08568
	Equal variances not assumed			-9,114	14,196	,000	-,11092	,01217	-,13698	-,08485

Mineralización celular (HISTOCELL), estudio por periodos

Periodo de ensayo = Periodo 7 días

Test of Homogeneity of Variances^a

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,171	9	110	,000

ANOVA^a

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,044	9	,005	14,132	,000
Within Groups	,038	110	,000		
Total	,082	119			

Periodo de ensayo = Periodo 14 días

Test of Homogeneity of Variances^a

Mineralización			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
26,126	9	110	,000

ANOVA^a

Mineralización					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,432	9	,048	17,081	,000
Within Groups	,309	110	,003		
Total	,741	119			

Kruskal-Wallis Test

Material Control-7M3T

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	3,867
df	1
Asymp. Sig.	,049

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	,807
df	1
Asymp. Sig.	,369

Material 7M3T-8M2T

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,348
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,432
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8M2T-9M1T

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	11,272
df	1
Asymp. Sig.	,001

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	6,809
df	1
Asymp. Sig.	,009

Material 9M1T-2V8G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,348
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,348
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 2V8G-5V5G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	10,687
df	1
Asymp. Sig.	,001

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	,214
df	1
Asymp. Sig.	,644

Material 5V5G-8V2G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	5,354
df	1
Asymp. Sig.	,021

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8V2G-2M8G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	,408
df	1
Asymp. Sig.	,523

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,295
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 2M8G-5M5G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	
df	
Asymp. Sig.	

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	
df	
Asymp. Sig.	

	Mineralización
Chi-Square	,101
df	1
Asymp. Sig.	,750

	Mineralización
Chi-Square	2,085
df	1
Asymp. Sig.	,149

Material 5M5G-8M2G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	7,245
df	1
Asymp. Sig.	,007

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	,121
df	1
Asymp. Sig.	,728

Material Control-8M2T

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	4,333
df	1
Asymp. Sig.	,037

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	3,319
df	1
Asymp. Sig.	,068

Material Control-9M1T

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	4,331
df	1
Asymp. Sig.	,037

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	4,094
df	1
Asymp. Sig.	,043

Material Control-2V8G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	4,331
df	1

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	4,094
df	1

Asymp. Sig.	,037
----------------	------

Asymp. Sig.	,043
----------------	------

Material Control-5V5G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	9,758
df	1
Asymp. Sig.	,002

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,333
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material Control-8V2G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	,214
df	1
Asymp. Sig.	,644

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	2,618
df	1
Asymp. Sig.	,106

Material Control-2M8G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	,215
df	1
Asymp. Sig.	,643

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	8,010
df	1
Asymp. Sig.	,005

Material Control-5M5G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	,021
df	1
Asymp. Sig.	,885

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	3,860
df	1
Asymp. Sig.	,049

Material Control-8M2G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	3,318
df	1
Asymp. Sig.	,069

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	1,413
df	1
Asymp. Sig.	,235

Material 7M3T-9M1T

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,340
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,424
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 7M3T-2V8G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	8,042
df	1
Asymp. Sig.	,005

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,432
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 7M3T-5V5G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	,912
df	1
Asymp. Sig.	,340

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,424
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 7M3T-8V2G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	13,311
df	1
Asymp. Sig.	,000

	Mineralización
Chi-Square	16,698
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 7M3T-2M8G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	4,722
df	1
Asymp. Sig.	,030

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	11,098
df	1
Asymp. Sig.	,001

Material 7M3T-5M5G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	,482
df	1
Asymp. Sig.	,487

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	1,934
df	1
Asymp. Sig.	,164

Material 7M3T-8M2G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	7,438
df	1
Asymp. Sig.	,006

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	5,394
df	1
Asymp. Sig.	,020

Material 8M2T-2V8G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,355
df	1

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,355
df	1

Asymp. Sig.	,000
-------------	------

Asymp. Sig.	,000
-------------	------

Material 8M2T-5V5G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	16,625
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,348
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8M2T-8V2G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,355
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	4,958
df	1
Asymp. Sig.	,026

Material 8M2T-2M8G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	15,460
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,318
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8M2T-5M5G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,348
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	13,288
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 8M2T-8M2G

Periodo 7 días

309

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	6,335
df	1
Asymp. Sig.	,012

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,401
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 9M1T-5V5G**Periodo 7 días**Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 díasTest Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,340
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 9M1T-8V2G**Periodo 7 días**Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,348
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 díasTest Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	10,123
df	1
Asymp. Sig.	,001

Material 9M1T-2M8G**Periodo 7 días**Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,325
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 díasTest Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,310
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 9M1T-5M5G**Periodo 7 días**Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,340

Periodo 14 díasTest Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,325

df	1
Asymp. Sig.	,000

df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 9M1T-8M2G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	13,265
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,393
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 2V8G-8V2G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	,214
df	1
Asymp. Sig.	,643

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,333
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 2V8G-2M8G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	6,335
df	1
Asymp. Sig.	,012

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	5,633
df	1
Asymp. Sig.	,018

Material 2V8G-5M5G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	4,591
df	1
Asymp. Sig.	,032

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	10,485
df	1
Asymp. Sig.	,001

Material 2V8G-8M2G

Periodo 7 díasTest Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	14,577
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 díasTest Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	10,527
df	1
Asymp. Sig.	,001

Material 5V5G-2M8G**Periodo 7 días**Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	1,925
df	1
Asymp. Sig.	,165

Periodo 14 díasTest Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	3,636
df	1
Asymp. Sig.	,057

Material 5V5G-5M5G**Periodo 7 días**Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	,405
df	1
Asymp. Sig.	,524

Periodo 14 díasTest Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	4,575
df	1
Asymp. Sig.	,032

Material 5V5G-8M2G**Periodo 7 días**Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	4,337
df	1
Asymp. Sig.	,037

Periodo 14 díasTest Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	5,368
df	1
Asymp. Sig.	,021

Material 8V2G-5M5G**Periodo 7 días**Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
--	----------------

Periodo 14 díasTest Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
--	----------------

Chi-Square	,214
df	1
Asymp. Sig.	,643

Chi-Square	5,343
df	1
Asymp. Sig.	,021

Material 8V2G-8M2G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	13,707
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	17,378
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 2M8G-8M2G

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	8,693
df	1
Asymp. Sig.	,003

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Mineralización
Chi-Square	3,430
df	1
Asymp. Sig.	,064

Ángulo de contacto

Materiales: 0 = 7M3T, 1 = 5M5G, 2 = Control

Test of Homogeneity of Variances

Angulo_cto

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,258	2	21	,028

Kruskal-Wallis Test

Material 0-1

Ranks

	Material	N	Mean Rank
Angulo_cto	0	6	4,17
	1	6	8,83
	Total	12	

Test Statistics^{a,b}

	Angulo_cto
Chi-Square	5,026
df	1
Asymp. Sig.	,025

Material 1-2

Ranks

Material	N	Mean Rank
Angulo_cto 1	6	3,50
2	12	12,50
Total	18	

Test Statistics^{a,b}

	Angulo_cto
Chi-Square	11,368
df	1
Asymp. Sig.	,001

Material 0-2

Ranks

Material	N	Mean Rank
Angulo_cto 0	6	3,50
2	12	12,50
Total	18	

Test Statistics^{a,b}

	Angulo_cto
Chi-Square	11,368
df	1
Asymp. Sig.	,001

Adhesión celular

Materiales: 0 = Control , 1 = 7M3T y 2 = 5M5G

Test of Homogeneity of Variances

Adhesión			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,303	2	6	,749

ANOVA

Adhesión					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,002	2	,001	79,026	,000
Within Groups	,000	6	,000		
Total	,002	8			

Multiple Comparisons

Adhesión
Bonferroni

(I) Material	(J) Material	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	,023012	,002518	,000	,01473	,03129
	2	-,007325	,002518	,081	-,01560	,00095
1	0	-,023012	,002518	,000	-,03129	-,01473
	2	-,030337 [*]	,002518	,000	-,03862	-,02206
2	0	,007325	,002518	,081	-,00095	,01560
	1	,030337 [*]	,002518	,000	,02206	,03862

Proliferación celular, estudio por materiales

Materiales: 7M3T, 5M5G, Control

Periodo 1 día

Test of Homogeneity of Variances^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,764	2	24	,038

Periodo 7 días

Test of Homogeneity of Variances^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
15,607	3	32	,000

Periodo 14 días

Test of Homogeneity of Variances^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
11,323	3	32	,000

Kruskal-Wallis Test

Materiales 7M3T-5M5G

Periodo 1 día

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Materiales 5M5G-Control

Periodo 1 día

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	11,502
df	2
Asymp. Sig.	,003

Periodo 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	17,429
df	2
Asymp. Sig.	,000

Materiales 7M3T-Control

Periodo 1 día**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 7 días**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	19,589
df	3
Asymp. Sig.	,000

Periodo 14 días**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	21,720
df	3
Asymp. Sig.	,000

Proliferación celular, estudio por materiales**Materiales: 7M3T, 5M5G, Control****Recubrimiento 7M3T****Test of Homogeneity of Variances^a**

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
44,198	2	24	,000

Recubrimiento 5M5G**Test of Homogeneity of Variances^a**

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
14,188	2	24	,000

CONTROL**Test of Homogeneity of Variances^a**

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
16,800	2	24	,000

Kruskal-Wallis Test**Periodo 1 día - 7 días****Recubrimiento 7M3T****Test Statistics^{a,b,c}**

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Recubrimiento 5M5G**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

CONTROL**Test Statistics^{a,b,c}**

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 7 días-14 días

Recubrimiento 7M3T

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Recubrimiento 5M5G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	2,388
df	1
Asymp. Sig.	,122

CONTROL

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 1 día - 14 días

Recubrimiento 7M3T

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Recubrimiento 5M5G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

CONTROL

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Diferenciación celular, estudio por periodos
Materiales: Control, 7M3T, 5M5G

T-Test

Control

Group Statistics^a

	Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Diferenciación	7	3	1,81790	,532698	,307553
	14	3	,34337	,032505	,018767

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper

Diferenciación	Equal variances assumed	6,907	,058	4,785	4	,009	1,474531	,308125	,619038	2,330024
	Equal variances not assumed			4,785	2,015	,040	1,474531	,308125	,158121	2,790941

Recubrimiento 7M3T

Group Statistics^a

	Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Diferenciación	7	3	1,98138	,507495	,293002
	14	3	,51312	,015373	,008876

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Diferenciación	Equal variances assumed	15,043	,018	5,009	4	,007	1,468253	,293137	,654375	2,282131
	Equal variances not assumed			5,009	2,004	,037	1,468253	,293137	,209199	2,727307

Recubrimiento 5M5G

Group Statistics^a

	Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Diferenciación	7	3	,83635	,063517	,036671
	14	3	1,02947	,109691	,063330

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper

Diferenciación	Equal variances assumed	1,236	,329	-2,639	4	,058	-,193122	,073181	-	,010062
	Equal variances not assumed			-2,639	3,206	,073	-,193122	,073181	-	,031546

Diferenciación celular, estudio por materiales

Materiales Control = 0, 7M3T = 1, 5M5G = 2

Periodo 7 días

Test of Homogeneity of Variances^a

ANOVA^a

Diferenciación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,036	2	6	,078

Diferenciación

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,301	2	1,151	6,330	,033
Within Groups	1,091	6	,182		
Total	3,392	8			

Multiple Comparisons^a

Dependent Variable: Diferenciación

	(I) Materia l	(J) Materia l	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	0	1	-,163475	,348123	,655	-1,01530	,68835
		2	,981550 [*]	,348123	,030	,12972	1,83338
	1	0	,163475	,348123	,655	-,68835	1,01530
		2	1,145025 [*]	,348123	,017	,29320	1,99685
2	0	-,981550	,348123	,030	-1,83338	-,12972	
	1	1,145025 [*]	,348123	,017	-1,99685	-,29320	

Periodo 14 días

Test of Homogeneity of Variances^a

ANOVA^a

Diferenciación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,448	2	6	,055

Diferenciación

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Group	,766	2	,383	86,248	,000

--	--	--	--

s				
Within Groups	,027	6	,004	
Total	,793	8		

Multiple Comparisons^a

Dependent Variable: Diferenciación

	(I) Materia	(J) Materia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	0	1	-,169753	,054416	,021	-,30290	-,03660
		2	-,686103 [*]	,054416	,000	-,81925	-,55295
	1	0	,169753 [*]	,054416	,021	,03660	,30290
		2	-,516350 [*]	,054416	,000	-,64950	-,38320
	2	0	,686103	,054416	,000	,55295	,81925
		1	,516350 [*]	,054416	,000	,38320	,64950

Kruskal-Wallis Test

Materiales Control-5M5G

Periodo 14 días

Ranks^a

	Materia	N	Mean Rank
Diferenciación	0	3	2,00
	2	3	5,00
	Total	6	

Test Statistics^{a,b,c}

	Diferenciación
Chi-Square	3,857
df	1
Asymp. Sig.	,050

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Media

Periodo	LSD	(I) Recubrimiento	(J) Recubrimiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
1 semana		Control1	7M3T1	1,46000	1,00041	,183	-,8470	3,7670
			5V5G	-2,99667 [*]	1,00041	,017	-5,3036	-,6897
			5M5G	1,23333	1,00041	,253	-1,0736	3,5403
		7M3T1	Control1	-1,46000	1,00041	,183	-3,7670	,8470

			5V5G	-4,45667 [*]	1,00041	,002	-6,7636	-2,1497
			5M5G	-,22667	1,00041	,826	-2,5336	2,0803
		5V5G	Control1	2,99667	1,00041	,017	,6897	5,3036
			7M3T1	4,45667 [*]	1,00041	,002	2,1497	6,7636
			5M5G	4,23000 [*]	1,00041	,003	1,9230	6,5370
		5M5G	Control1	-1,23333	1,00041	,253	-3,5403	1,0736
			7M3T1	,22667	1,00041	,826	-2,0803	2,5336
			5V5G	-4,23000 [*]	1,00041	,003	-6,5370	-1,9230
2	LSD	Control1	7M3T1	-,54667	1,43092	,712	-3,8464	2,7530
semanas			5V5G	-2,11333	1,43092	,178	-5,4130	1,1864
			5M5G	,89000	1,43092	,551	-2,4097	4,1897
		7M3T1	Control1	,54667	1,43092	,712	-2,7530	3,8464
			5V5G	-1,56667	1,43092	,305	-4,8664	1,7330
			5M5G	1,43667	1,43092	,345	-1,8630	4,7364
		5V5G	Control1	2,11333	1,43092	,178	-1,1864	5,4130
			7M3T1	1,56667	1,43092	,305	-1,7330	4,8664
			5M5G	3,00333	1,43092	,069	-,2964	6,3030
		5M5G	Control1	-,89000	1,43092	,551	-4,1897	2,4097
			7M3T1	-1,43667	1,43092	,345	-4,7364	1,8630
			5V5G	-3,00333	1,43092	,069	-6,3030	,2964
4	LSD	Control1	7M3T1	,11000	1,20745	,930	-2,6744	2,8944
semanas			5V5G	-3,29000 [*]	1,20745	,026	-6,0744	-,5056
			5M5G	-1,34000	1,20745	,299	-4,1244	1,4444
		7M3T1	Control1	-,11000	1,20745	,930	-2,8944	2,6744
			5V5G	-3,40000 [*]	1,20745	,023	-6,1844	-,6156
			5M5G	-1,45000	1,20745	,264	-4,2344	1,3344
		5V5G	Control1	3,29000	1,20745	,026	,5056	6,0744
			7M3T1	3,40000 [*]	1,20745	,023	,6156	6,1844
			5M5G	1,95000	1,20745	,145	-,8344	4,7344
		5M5G	Control1	1,34000	1,20745	,299	-1,4444	4,1244
			7M3T1	1,45000	1,20745	,264	-1,3344	4,2344
			5V5G	-1,95000	1,20745	,145	-4,7344	,8344
8	LSD	Control1	7M3T1	2,70667	2,05575	,224	-2,0339	7,4472
semanas			5V5G	-1,34000	2,05575	,533	-6,0806	3,4006
			5M5G	-1,35667	2,05575	,528	-6,0972	3,3839
		7M3T1	Control1	-2,70667	2,05575	,224	-7,4472	2,0339
			5V5G	-4,04667	2,05575	,085	-8,7872	,6939
			5M5G	-4,06333	2,05575	,083	-8,8039	,6772

5V5G	Control1	1,34000	2,05575	,533	-3,4006	6,0806
	7M3T1	4,04667	2,05575	,085	-,6939	8,7872
	5M5G	-,01667	2,05575	,994	-4,7572	4,7239
5M5G	Control1	1,35667	2,05575	,528	-3,3839	6,0972
	7M3T1	4,06333	2,05575	,083	-,6772	8,8039
	5V5G	,01667	2,05575	,994	-4,7239	4,7572

Histomorfometría Panorámica, estudio por periodos

Materiales 0 = Control , 1 = 7M3T, 2 = 5V5G, 3 = 5M5G

Test of Homogeneity of Variances

Periodo	Levene Statistic	df1	df2	Sig.	Periodo	Levene Statistic	df1	df2	Sig.		
1	EH_ad	2,376	3	8	,146	4	EH_ad	2,688	3	8	,117
	EH_ai	3,015	3	8	,094		EH_ai	,835	3	8	,511
	EH_bd	13,577	3	8	,002		EH_bd	8,680	3	8	,007
	EH_bi	16,000	3	8	,001		EH_bi	8,822	3	8	,006
	VSTi	5,906	3	8	,020		VSTi	6,661	3	8	,014
	VSTe	7,208	3	8	,012		VSTe	9,972	3	8	,004
	HSTi	5,408	3	8	,025		HSTi	7,544	3	8	,010
	HSTe	5,381	3	8	,025		HSTe	6,066	3	8	,019
	A_canal	4,786	3	8	,034		A_canal	5,803	3	8	,021
	P_canal	6,698	3	8	,014		P_canal	7,966	3	8	,009
	E_cor_d	3,760	3	8	,060		E_cor_d	3,003	3	8	,095
	E_cor_i	,815	3	8	,521		E_cor_i	5,292	3	8	,027
	2	EH_ad	6,696	3	8		,014	8	EH_ad	1,067	3
EH_ai		1,586	3	8	,267	EH_ai	1,558		3	7	,283
EH_bd		7,044	3	8	,012	EH_bd	46,074		3	7	,000
EH_bi		1,012	3	8	,437	EH_bi	.		3	.	.
VSTi		1,319	3	8	,334	VSTi	3,214		3	7	,092
VSTe		5,509	3	8	,024	VSTe	4,537		3	7	,046
HSTi		8,254	3	8	,008	HSTi	1,640		3	7	,265
HSTe		5,624	3	8	,023	HSTe	,239		3	7	,866
A_canal		3,795	3	8	,058	A_canal	3,255		3	7	,090
P_canal		8,151	3	8	,008	P_canal	2,279		3	7	,167

E_cor_d	1,609	3	8	,262	E_cor_d	8,389	3	7	,010
E_cor_i	1,030	3	8	,430	E_cor_i	,760	3	7	,551

ANOVA

Periodo		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 EH_ad	Between Groups	2,459	3	,820	,517	,682
	Within Groups	12,689	8	1,586		
	Total	15,148	11			
EH_ai	Between Groups	2,579	3	,860	1,605	,263
	Within Groups	4,285	8	,536		
	Total	6,864	11			
EH_bd	Between Groups	,532	3	,177	,849	,505
	Within Groups	1,672	8	,209		
	Total	2,204	11			
EH_bi	Between Groups	,212	3	,071	1,000	,441
	Within Groups	,564	8	,071		
	Total	,776	11			
VSTi	Between Groups	5,250	3	1,750	,179	,908
	Within Groups	78,317	8	9,790		
	Total	83,567	11			
VSTe	Between Groups	29,169	3	9,723	,738	,559
	Within Groups	105,458	8	13,182		
	Total	134,627	11			
HSTi	Between Groups	9,071	3	3,024	,273	,843
	Within Groups	88,599	8	11,075		
	Total	97,670	11			
HSTe	Between Groups	49,945	3	16,648	,803	,526
	Within Groups	165,787	8	20,723		
	Total	215,731	11			

A_canal	Between Groups	116,592	3	38,864	,084	,967
	Within Groups	3705,215	8	463,152		
	Total	3821,807	11			
P_canal	Between Groups	45,343	3	15,114	,144	,931
	Within Groups	841,416	8	105,177		
	Total	886,760	11			
E_cor_d	Between Groups	,719	3	,240	,886	,488
	Within Groups	2,162	8	,270		
	Total	2,881	11			
E_cor_i	Between Groups	,863	3	,288	1,033	,428
	Within Groups	2,227	8	,278		
	Total	3,090	11			
2 EH_ad	Between Groups	,113	3	,038	,078	,970
	Within Groups	3,869	8	,484		
	Total	3,982	11			
EH_ai	Between Groups	1,183	3	,394	,533	,672
	Within Groups	5,918	8	,740		
	Total	7,100	11			
EH_bd	Between Groups	2,568	3	,856	2,279	,156
	Within Groups	3,004	8	,376		
	Total	5,573	11			
EH_bi	Between Groups	,943	3	,314	,663	,598
	Within Groups	3,795	8	,474		
	Total	4,738	11			
VSTi	Between Groups	1,304	3	,435	,416	,746
	Within Groups	8,353	8	1,044		
	Total	9,656	11			
VSTe	Between Groups	3,083	3	1,028	,429	,738
	Within Groups					
	Total					

	Within Groups	19,144	8	2,393			
	Total	22,227	11				
HSTi	Between Groups	23,529	3	7,843	1,016	,435	
	Within Groups	61,771	8	7,721			
	Total	85,300	11				
HSTe	Between Groups	55,341	3	18,447	1,232	,360	
	Within Groups	119,829	8	14,979			
	Total	175,170	11				
A_canal	Between Groups	1073,769	3	357,923	1,426	,305	
	Within Groups	2007,467	8	250,933			
	Total	3081,236	11				
P_canal	Between Groups	286,540	3	95,513	1,428	,305	
	Within Groups	535,150	8	66,894			
	Total	821,690	11				
E_cor_d	Between Groups	,283	3	,094	2,646	,121	
	Within Groups	,286	8	,036			
	Total	,569	11				
E_cor_i	Between Groups	,280	3	,093	1,874	,212	
	Within Groups	,398	8	,050			
	Total	,678	11				
4	EH_ad	Between Groups	3,553	3	1,184	2,026	,189
		Within Groups	4,677	8	,585		
		Total	8,229	11			
	EH_ai	Between Groups	3,010	3	1,003	1,678	,248
		Within Groups	4,784	8	,598		
		Total	7,794	11			
	EH_bd	Between Groups	1,082	3	,361	,542	,667
		Within Groups	5,317	8	,665		
		Total	6,399	11			
	EH_bi	Between Groups	,862	3	,287	,551	,661

	Within Groups	4,169	8	,521		
	Total	5,030	11			
VSTi	Between Groups	6,540	3	2,180	,252	,858
	Within Groups	69,177	8	8,647		
	Total	75,717	11			
VSTe	Between Groups	13,416	3	4,472	,298	,826
	Within Groups	119,975	8	14,997		
	Total	133,392	11			
HSTi	Between Groups	19,663	3	6,554	2,044	,186
	Within Groups	25,659	8	3,207		
	Total	45,322	11			
HSTe	Between Groups	42,533	3	14,178	3,553	,067
	Within Groups	31,919	8	3,990		
	Total	74,452	11			
A_canal	Between Groups	259,106	3	86,369	,208	,888
	Within Groups	3319,508	8	414,938		
	Total	3578,613	11			
P_canal	Between Groups	68,070	3	22,690	,236	,869
	Within Groups	768,910	8	96,114		
	Total	836,980	11			
E_cor_d	Between Groups	,648	3	,216	2,320	,152
	Within Groups	,745	8	,093		
	Total	1,394	11			
E_cor_i	Between Groups	1,466	3	,489	1,839	,218
	Within Groups	2,126	8	,266		
	Total	3,592	11			
8 EH_ad	Between Groups	,616	3	,205	,419	,745
	Within Groups	3,428	7	,490		
	Total	4,044	10			
EH_ai	Between Groups	1,241	3	,414	,554	,661
	Within Groups	5,224	7	,746		
	Total	6,466	10			
EH_bd	Between Groups	,161	3	,054	1,300	,347
	Within Groups	,288	7	,041		
	Total					

	Total		,449	10				
EH_bi	Between Groups		,230	3	,077	1,909	,217	
	Within Groups		,281	7	,040			
	Total		,511	10				
VSTi	Between Groups		1,634	3	,545	,303	,823	
	Within Groups		12,579	7	1,797			
	Total		14,212	10				
VSTe	Between Groups		,677	3	,226	,141	,932	
	Within Groups		11,227	7	1,604			
	Total		11,904	10				
HSTi	Between Groups		2,191	3	,730	,273	,843	
	Within Groups		18,701	7	2,672			
	Total		20,892	10				
HSTe	Between Groups		6,394	3	2,131	,402	,756	
	Within Groups		37,131	7	5,304			
	Total		43,524	10				
A_canal	Between Groups		57,861	3	19,287	,113	,950	
	Within Groups		1197,292	7	171,042			
	Total		1255,153	10				
P_canal	Between Groups		16,663	3	5,554	,321	,811	
	Within Groups		121,277	7	17,325			
	Total		137,941	10				
E_cor_d	Between Groups		,243	3	,081	,312	,816	
	Within Groups		1,815	7	,259			
	Total		2,058	10				
E_cor_i	Between Groups		,073	3	,024	,043	,987	
	Within Groups		3,910	7	,559			
	Total		3,983	10				

Multiple Comparisons

Periodo	Dependent Variable	(I) Material	(J) Material	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound

1	EH_ad	LSD	0	1	-45333	1,02829	,671	-2,8246	1,9179
				2	-1,15333	1,02829	,295	-3,5246	1,2179
				3	-,09667	1,02829	,927	-2,4679	2,2746
		1	0	,45333	1,02829	,671	-1,9179	2,8246	
		2		-,70000	1,02829	,515	-3,0712	1,6712	
		3		,35667	1,02829	,738	-2,0146	2,7279	
		2	0	1,15333	1,02829	,295	-1,2179	3,5246	
		1		,70000	1,02829	,515	-1,6712	3,0712	
		3		1,05667	1,02829	,334	-1,3146	3,4279	
	3	0	-,09667	1,02829	,927	-2,2746	2,4679		
	1		-,35667	1,02829	,738	-2,7279	2,0146		
	2		-1,05667	1,02829	,334	-3,4279	1,3146		
	EH_ai	LSD	0	1	-,32333	,59755	,603	-1,7013	1,0546
				2	-,98667	,59755	,137	-2,3646	,3913
				3	,25000	,59755	,687	-1,1280	1,6280
		1	0	,32333	,59755	,603	-1,0546	1,7013	
		2		-,66333	,59755	,299	-2,0413	,7146	
		3		,57333	,59755	,365	-,8046	1,9513	
		2	0	,98667	,59755	,137	-,3913	2,3646	
		1		,66333	,59755	,299	-,7146	2,0413	
		3		1,23667	,59755	,072	-,1413	2,6146	
3		0	-,25000	,59755	,687	-1,6280	1,1280		
1			-,57333	,59755	,365	-1,9513	,8046		
2			-1,23667	,59755	,072	-2,6146	,1413		
EH_bd	LSD	0	1	-,12333	,37331	,750	-,9842	,7375	
			2	,00000	,37331	1,000	-,8609	,8609	
			3	-,51333	,37331	,206	-1,3742	,3475	
	1	0	,12333	,37331	,750	-,7375	,9842		
	2		,12333	,37331	,750	-,7375	,9842		
	3		-,39000	,37331	,327	-1,2509	,4709		
	2	0	,00000	,37331	1,000	-,8609	,8609		
	1		-,12333	,37331	,750	-,9842	,7375		
	3		-,51333	,37331	,206	-1,3742	,3475		
	3	0	,51333	,37331	,206	-,3475	1,3742		
	1		,39000	,37331	,327	-,4709	1,2509		
	2		,51333	,37331	,206	-,3475	1,3742		
EH_bi	LSD	0	1	-,30667	,21685	,195	-,8067	,1934	
			2	,00000	,21685	1,000	-,5000	,5000	
			3	,00000	,21685	1,000	-,5000	,5000	
			1	0	,30667	,21685	,195	-,1934	,8067

			2	,30667	,21685	,195	-,1934	,8067
			3	,30667	,21685	,195	-,1934	,8067
		2	0	,00000	,21685	1,000	-,5000	,5000
			1	-,30667	,21685	,195	-,8067	,1934
			3	,00000	,21685	1,000	-,5000	,5000
		3	0	,00000	,21685	1,000	-,5000	,5000
			1	-,30667	,21685	,195	-,8067	,1934
			2	,00000	,21685	1,000	-,5000	,5000
VSTi	LSD	0	1	-,17000	2,55469	,949	-6,0611	5,7211
			2	-1,62333	2,55469	,543	-7,5145	4,2678
			3	-1,05667	2,55469	,690	-6,9478	4,8345
		1	0	,17000	2,55469	,949	-5,7211	6,0611
			2	-1,45333	2,55469	,585	-7,3445	4,4378
			3	-,88667	2,55469	,737	-6,7778	5,0045
		2	0	1,62333	2,55469	,543	-4,2678	7,5145
			1	1,45333	2,55469	,585	-4,4378	7,3445
			3	,56667	2,55469	,830	-5,3245	6,4578
		3	0	1,05667	2,55469	,690	-4,8345	6,9478
			1	,88667	2,55469	,737	-5,0045	6,7778
			2	-,56667	2,55469	,830	-6,4578	5,3245
VSTe	LSD	0	1	-1,19333	2,96448	,698	-8,0294	5,6428
			2	-4,19667	2,96448	,195	-	2,6394
			3	-2,50000	2,96448	,424	11,0328 -9,3361	4,3361
		1	0	1,19333	2,96448	,698	-5,6428	8,0294
			2	-3,00333	2,96448	,341	-9,8394	3,8328
			3	-1,30667	2,96448	,671	-8,1428	5,5294
		2	0	4,19667	2,96448	,195	-2,6394	11,0328
			1	3,00333	2,96448	,341	-3,8328	9,8394
			3	1,69667	2,96448	,583	-5,1394	8,5328
		3	0	2,50000	2,96448	,424	-4,3361	9,3361
			1	1,30667	2,96448	,671	-5,5294	8,1428
			2	-1,69667	2,96448	,583	-8,5328	5,1394
HSTi	LSD	0	1	-1,14333	2,71721	,685	-7,4092	5,1226
			2	-1,62667	2,71721	,566	-7,8926	4,6392
			3	-2,39667	2,71721	,403	-8,6626	3,8692
		1	0	1,14333	2,71721	,685	-5,1226	7,4092
			2	-,48333	2,71721	,863	-6,7492	5,7826
			3	-1,25333	2,71721	,657	-7,5192	5,0126
		2	0	1,62667	2,71721	,566	-4,6392	7,8926
			1	,48333	2,71721	,863	-5,7826	6,7492

		3	- ,77000	2,71721	,784	-7,0359	5,4959	
		3	0	2,39667	2,71721	,403	-3,8692	8,6626
			1	1,25333	2,71721	,657	-5,0126	7,5192
			2	,77000	2,71721	,784	-5,4959	7,0359
HSTe	LSD	0	1	-1,28333	3,71693	,739	-9,8546	7,2879
			2	-5,43333	3,71693	,182	-	3,1379
			3	-3,07000	3,71693	,433	14,0046	-
							11,6413	5,5013
		1	0	1,28333	3,71693	,739	-7,2879	9,8546
			2	-4,15000	3,71693	,297	-	4,4213
			3	-1,78667	3,71693	,644	12,7213	-
							10,3579	6,7846
		2	0	5,43333	3,71693	,182	-3,1379	14,0046
			1	4,15000	3,71693	,297	-4,4213	12,7213
			3	2,36333	3,71693	,543	-6,2079	10,9346
		3	0	3,07000	3,71693	,433	-5,5013	11,6413
			1	1,78667	3,71693	,644	-6,7846	10,3579
			2	-2,36333	3,71693	,543	-	6,2079
							10,9346	
A_canal	LSD	0	1	2,27333	17,57179	,900	-	42,7940
			2	-4,06333	17,57179	,823	38,2473	-
			3	-5,53000	17,57179	,761	-	36,4573
							44,5840	-
							46,0506	34,9906
		1	0	-2,27333	17,57179	,900	-	38,2473
			2	-6,33667	17,57179	,728	42,7940	-
			3	-7,80333	17,57179	,669	-	34,1840
							46,8573	-
							48,3240	32,7173
		2	0	4,06333	17,57179	,823	-	44,5840
			1	6,33667	17,57179	,728	36,4573	-
			3	-1,46667	17,57179	,936	-	46,8573
							34,1840	-
							41,9873	39,0540
		3	0	5,53000	17,57179	,761	-	46,0506
			1	7,80333	17,57179	,669	34,9906	-
			2	1,46667	17,57179	,936	-	48,3240
							32,7173	-
							39,0540	41,9873
P_canal	LSD	0	1	-2,38000	8,37365	,783	-	16,9297
			2	-4,62667	8,37365	,596	21,6897	-
			3	-4,76000	8,37365	,585	-	14,6830
							23,9363	-
							24,0697	14,5497
		1	0	2,38000	8,37365	,783	-	21,6897
			2	-2,24667	8,37365	,795	16,9297	-
			3	-2,38000	8,37365	,783	-	17,0630
							21,5563	-
							21,6897	16,9297
		2	0	4,62667	8,37365	,596	-	23,9363
			1	2,24667	8,37365	,795	14,6830	-
							-	21,5563
							17,0630	

			3		-,13333	8,37365	,988	-	19,1763
			3	0	4,76000	8,37365	,585	19,4430	24,0697
				1	2,38000	8,37365	,783	14,5497	21,6897
				2	,13333	8,37365	,988	16,9297	19,4430
								19,1763	
E_cor_d	LSD	0		1	-,546667	,424460	,234	-	,43214
				2	,093333	,424460	,831	1,52547	1,07214
				3	-,176667	,424460	,688	-,88547	,80214
								1,15547	
			1	0	,546667	,424460	,234	-,43214	1,52547
				2	,640000	,424460	,170	-,33881	1,61881
				3	,370000	,424460	,409	-,60881	1,34881
			2	0	-,093333	,424460	,831	-	,88547
				1	-,640000	,424460	,170	1,07214	,33881
				3	-,270000	,424460	,542	1,61881	,70881
								1,24881	
			3	0	,176667	,424460	,688	-,80214	1,15547
				1	-,370000	,424460	,409	-	,60881
				2	,270000	,424460	,542	1,34881	1,24881
								-,70881	
E_cor_i	LSD	0		1	-,32000	,43083	,479	-1,3135	,6735
				2	,40667	,43083	,373	-,5868	1,4002
				3	-,14333	,43083	,748	-1,1368	,8502
			1	0	,32000	,43083	,479	-,6735	1,3135
				2	,72667	,43083	,130	-,2668	1,7202
				3	,17667	,43083	,693	-,8168	1,1702
			2	0	-,40667	,43083	,373	-1,4002	,5868
				1	-,72667	,43083	,130	-1,7202	,2668
				3	-,55000	,43083	,238	-1,5435	,4435
			3	0	,14333	,43083	,748	-,8502	1,1368
				1	-,17667	,43083	,693	-1,1702	,8168
				2	,55000	,43083	,238	-,4435	1,5435
2	EH_ad	LSD	0	1	-,19000	,56779	,747	-1,4993	1,1193
				2	,02000	,56779	,973	-1,2893	1,3293
				3	-,17667	,56779	,764	-1,4860	1,1327
			1	0	,19000	,56779	,747	-1,1193	1,4993
				2	,21000	,56779	,721	-1,0993	1,5193
				3	,01333	,56779	,982	-1,2960	1,3227
			2	0	-,02000	,56779	,973	-1,3293	1,2893
				1	-,21000	,56779	,721	-1,5193	1,0993
				3	-,19667	,56779	,738	-1,5060	1,1127
			3	0	,17667	,56779	,764	-1,1327	1,4860

			1	-,01333	,56779	,982	-1,3227	1,2960
			2	,19667	,56779	,738	-1,1127	1,5060
EH_ai	LSD	0	1	,38667	,70225	,597	-1,2327	2,0060
			2	,34000	,70225	,641	-1,2794	1,9594
			3	,88000	,70225	,246	-,7394	2,4994
		1	0	-,38667	,70225	,597	-2,0060	1,2327
			2	-,04667	,70225	,949	-1,6660	1,5727
			3	,49333	,70225	,502	-1,1260	2,1127
		2	0	-,34000	,70225	,641	-1,9594	1,2794
			1	,04667	,70225	,949	-1,5727	1,6660
			3	,54000	,70225	,464	-1,0794	2,1594
		3	0	-,88000	,70225	,246	-2,4994	,7394
			1	-,49333	,70225	,502	-2,1127	1,1260
			2	-,54000	,70225	,464	-2,1594	1,0794
EH_bd	LSD	0	1	-,29000	,50037	,578	-1,4439	,8639
			2	-,21000	,50037	,686	-1,3639	,9439
			3	-1,20667	,50037	,042	-2,3605	-,0528
		1	0	,29000	,50037	,578	-,8639	1,4439
			2	,08000	,50037	,877	-1,0739	1,2339
			3	-,91667	,50037	,104	-2,0705	,2372
		2	0	,21000	,50037	,686	-,9439	1,3639
			1	-,08000	,50037	,877	-1,2339	1,0739
			3	-,99667	,50037	,082	-2,1505	,1572
		3	0	1,20667	,50037	,042	,0528	2,3605
			1	,91667	,50037	,104	-,2372	2,0705
			2	,99667	,50037	,082	-,1572	2,1505
EH_bi	LSD	0	1	,05333	,56237	,927	-1,2435	1,3502
			2	,11000	,56237	,850	-1,1868	1,4068
			3	-,58667	,56237	,327	-1,8835	,7102
		1	0	-,05333	,56237	,927	-1,3502	1,2435
			2	,05667	,56237	,922	-1,2402	1,3535
			3	-,64000	,56237	,288	-1,9368	,6568
		2	0	-,11000	,56237	,850	-1,4068	1,1868
			1	-,05667	,56237	,922	-1,3535	1,2402
			3	-,69667	,56237	,251	-1,9935	,6002
		3	0	,58667	,56237	,327	-,7102	1,8835
			1	,64000	,56237	,288	-,6568	1,9368
			2	,69667	,56237	,251	-,6002	1,9935
VSTi	LSD	0	1	,26667	,83429	,757	-1,6572	2,1905
			2	-,45333	,83429	,602	-2,3772	1,4705

			3	,41333	,83429	,634	-1,5105	2,3372
		1	0	-,26667	,83429	,757	-2,1905	1,6572
			2	-,72000	,83429	,413	-2,6439	1,2039
			3	,14667	,83429	,865	-1,7772	2,0705
		2	0	,45333	,83429	,602	-1,4705	2,3772
			1	,72000	,83429	,413	-1,2039	2,6439
			3	,86667	,83429	,329	-1,0572	2,7905
		3	0	-,41333	,83429	,634	-2,3372	1,5105
			1	-,14667	,83429	,865	-2,0705	1,7772
			2	-,86667	,83429	,329	-2,7905	1,0572
VSTe	LSD	0	1	-,22000	1,26306	,866	-3,1326	2,6926
			2	-,81667	1,26306	,536	-3,7293	2,0960
			3	,60000	1,26306	,647	-2,3126	3,5126
		1	0	,22000	1,26306	,866	-2,6926	3,1326
			2	-,59667	1,26306	,649	-3,5093	2,3160
			3	,82000	1,26306	,534	-2,0926	3,7326
		2	0	,81667	1,26306	,536	-2,0960	3,7293
			1	,59667	1,26306	,649	-2,3160	3,5093
			3	1,41667	1,26306	,295	-1,4960	4,3293
		3	0	-,60000	1,26306	,647	-3,5126	2,3126
			1	-,82000	1,26306	,534	-3,7326	2,0926
			2	-1,41667	1,26306	,295	-4,3293	1,4960
HSTi	LSD	0	1	3,80333	2,26882	,132	-1,4286	9,0352
			2	,97333	2,26882	,679	-4,2586	6,2052
			3	1,37333	2,26882	,562	-3,8586	6,6052
		1	0	-3,80333	2,26882	,132	-9,0352	1,4286
			2	-2,83000	2,26882	,248	-8,0619	2,4019
			3	-2,43000	2,26882	,315	-7,6619	2,8019
		2	0	-,97333	2,26882	,679	-6,2052	4,2586
			1	2,83000	2,26882	,248	-2,4019	8,0619
			3	,40000	2,26882	,864	-4,8319	5,6319
		3	0	-1,37333	2,26882	,562	-6,6052	3,8586
			1	2,43000	2,26882	,315	-2,8019	7,6619
			2	-,40000	2,26882	,864	-5,6319	4,8319
HSTe	LSD	0	1	5,94667	3,16002	,097	-1,3404	13,2337
			2	1,90333	3,16002	,564	-5,3837	9,1904
			3	2,56000	3,16002	,441	-4,7270	9,8470
		1	0	-5,94667	3,16002	,097	-	1,3404
			2	-4,04333	3,16002	,237	13,2337	-
			3	-3,38667	3,16002	,315	11,3304	-
							-	3,9004

					10,6737			
	2	0	-1,90333	3,16002	,564	-9,1904	5,3837	
		1	4,04333	3,16002	,237	-3,2437	11,3304	
		3	,65667	3,16002	,841	-6,6304	7,9437	
	3	0	-2,56000	3,16002	,441	-9,8470	4,7270	
		1	3,38667	3,16002	,315	-3,9004	10,6737	
		2	-,65667	3,16002	,841	-7,9437	6,6304	
A_canal	LSD	0	1	25,33333	12,93402	,086	-4,4926	55,1592
			2	5,49333	12,93402	,682	-	35,3192
			3	12,18333	12,93402	,374	24,3326	-
							17,6426	42,0092
	1	0	-25,33333	12,93402	,086	-	-	4,4926
		2	-19,84000	12,93402	,164	55,1592	-	9,9859
		3	-13,15000	12,93402	,339	49,6659	-	16,6759
						42,9759	-	-
	2	0	-5,49333	12,93402	,682	-	-	24,3326
		1	19,84000	12,93402	,164	35,3192	-	49,6659
		3	6,69000	12,93402	,619	-9,9859	-	36,5159
						23,1359	-	-
	3	0	-12,18333	12,93402	,374	-	-	17,6426
		1	13,15000	12,93402	,339	42,0092	-	42,9759
		2	-6,69000	12,93402	,619	16,6759	-	23,1359
						36,5159	-	-
P_canal	LSD	0	1	13,19667	6,67801	,084	-2,2029	28,5962
			2	3,05000	6,67801	,660	-	18,4495
			3	5,65667	6,67801	,422	12,3495	-
							-9,7429	21,0562
	1	0	-13,19667	6,67801	,084	-	-	2,2029
		2	-10,14667	6,67801	,167	28,5962	-	5,2529
		3	-7,54000	6,67801	,292	25,5462	-	7,8595
						22,9395	-	-
	2	0	-3,05000	6,67801	,660	-	-	12,3495
		1	10,14667	6,67801	,167	18,4495	-	25,5462
		3	2,60667	6,67801	,706	-5,2529	-	18,0062
						12,7929	-	-
	3	0	-5,65667	6,67801	,422	-	-	9,7429
		1	7,54000	6,67801	,292	21,0562	-	22,9395
		2	-2,60667	6,67801	,706	-7,8595	-	12,7929
						18,0062	-	-
E_cor_d	LSD	0	1	-,326667	,154308	,067	-,68250	,02917
			2	-,053333	,154308	,739	-,40917	,30250
			3	-,336667	,154308	,061	-,69250	,01917
	1	0	,326667	,154308	,067	-,02917	,68250	,68250
		2	,273333	,154308	,114	-,08250	,62917	,62917
		3	-,010000	,154308	,950	-,36584	,34584	,34584

			2	0	,053333	,154308	,739	-,30250	,40917
				1	-,273333	,154308	,114	-,62917	,08250
				3	-,283333	,154308	,104	-,63917	,07250
			3	0	,336667	,154308	,061	-,01917	,69250
				1	,010000	,154308	,950	-,34584	,36584
				2	,283333	,154308	,104	-,07250	,63917
	E_cor_i	LSD	0	1	-,29000	,18219	,150	-,7101	,1301
				2	-,05667	,18219	,764	-,4768	,3635
				3	-,36333	,18219	,081	-,7835	,0568
			1	0	,29000	,18219	,150	-,1301	,7101
				2	,23333	,18219	,236	-,1868	,6535
				3	-,07333	,18219	,698	-,4935	,3468
			2	0	,05667	,18219	,764	-,3635	,4768
				1	-,23333	,18219	,236	-,6535	,1868
				3	-,30667	,18219	,131	-,7268	,1135
			3	0	,36333	,18219	,081	-,0568	,7835
				1	,07333	,18219	,698	-,3468	,4935
				2	,30667	,18219	,131	-,1135	,7268
4	EH_ad	LSD	0	1	,25667	,62427	,692	-1,1829	1,6962
				2	-,68333	,62427	,306	-2,1229	,7562
				3	-1,11667	,62427	,111	-2,5562	,3229
			1	0	-,25667	,62427	,692	-1,6962	1,1829
				2	-,94000	,62427	,171	-2,3796	,4996
				3	-1,37333	,62427	,059	-2,8129	,0662
			2	0	,68333	,62427	,306	-,7562	2,1229
				1	,94000	,62427	,171	-,4996	2,3796
				3	-,43333	,62427	,507	-1,8729	1,0062
			3	0	1,11667	,62427	,111	-,3229	2,5562
				1	1,37333	,62427	,059	-,0662	2,8129
				2	,43333	,62427	,507	-1,0062	1,8729
	EH_ai	LSD	0	1	-,84333	,63140	,218	-2,2993	,6127
				2	-1,40667	,63140	,056	-2,8627	,0493
				3	-,78333	,63140	,250	-2,2393	,6727
			1	0	,84333	,63140	,218	-,6127	2,2993
				2	-,56333	,63140	,398	-2,0193	,8927
				3	,06000	,63140	,927	-1,3960	1,5160
			2	0	1,40667	,63140	,056	-,0493	2,8627
				1	,56333	,63140	,398	-,8927	2,0193
				3	,62333	,63140	,352	-,8327	2,0793
			3	0	,78333	,63140	,250	-,6727	2,2393

			1	-,06000	,63140	,927	-1,5160	1,3960	
			2	-,62333	,63140	,352	-2,0793	,8327	
EH_bd	LSD	0	1	-,22000	,66565	,750	-1,7550	1,3150	
			2	-,41333	,66565	,552	-1,9483	1,1217	
			3	-,81667	,66565	,255	-2,3517	,7183	
			1	0	,22000	,66565	,750	-1,3150	1,7550
			2	-,19333	,66565	,779	-1,7283	1,3417	
			3	-,59667	,66565	,396	-2,1317	,9383	
			2	0	,41333	,66565	,552	-1,1217	1,9483
			1	,19333	,66565	,779	-1,3417	1,7283	
			3	-,40333	,66565	,561	-1,9383	1,1317	
			3	0	,81667	,66565	,255	-,7183	2,3517
			1	,59667	,66565	,396	-,9383	2,1317	
			2	,40333	,66565	,561	-1,1317	1,9383	
EH_bi	LSD	0	1	,47667	,58939	,442	-,8825	1,8358	
			2	,74333	,58939	,243	-,6158	2,1025	
			3	,47667	,58939	,442	-,8825	1,8358	
			1	0	-,47667	,58939	,442	-1,8358	,8825
			2	,26667	,58939	,663	-1,0925	1,6258	
			3	,00000	,58939	1,000	-1,3591	1,3591	
			2	0	-,74333	,58939	,243	-2,1025	,6158
			1	-,26667	,58939	,663	-1,6258	1,0925	
			3	-,26667	,58939	,663	-1,6258	1,0925	
			3	0	-,47667	,58939	,442	-1,8358	,8825
			1	,00000	,58939	1,000	-1,3591	1,3591	
			2	,26667	,58939	,663	-1,0925	1,6258	
VSTi	LSD	0	1	1,04667	2,40100	,674	-4,4900	6,5834	
			2	1,43667	2,40100	,566	-4,1000	6,9734	
			3	-,37000	2,40100	,881	-5,9067	5,1667	
			1	0	-1,04667	2,40100	,674	-6,5834	4,4900
			2	,39000	2,40100	,875	-5,1467	5,9267	
			3	-1,41667	2,40100	,571	-6,9534	4,1200	
			2	0	-1,43667	2,40100	,566	-6,9734	4,1000
			1	-,39000	2,40100	,875	-5,9267	5,1467	
			3	-1,80667	2,40100	,473	-7,3434	3,7300	
			3	0	,37000	2,40100	,881	-5,1667	5,9067
			1	1,41667	2,40100	,571	-4,1200	6,9534	
			2	1,80667	2,40100	,473	-3,7300	7,3434	
VSTe	LSD	0	1	1,01000	3,16195	,758	-6,2815	8,3015	
			2	2,78333	3,16195	,404	-4,5081	10,0748	

			3	,44667	3,16195	,891	-6,8448	7,7381
		1	0	-1,01000	3,16195	,758	-8,3015	6,2815
			2	1,77333	3,16195	,590	-5,5181	9,0648
			3	-,56333	3,16195	,863	-7,8548	6,7281
		2	0	-2,78333	3,16195	,404	-	4,5081
			1	-1,77333	3,16195	,590	10,0748	5,5181
			3	-2,33667	3,16195	,481	-9,0648	4,9548
		3	0	-,44667	3,16195	,891	-7,7381	6,8448
			1	,56333	3,16195	,863	-6,7281	7,8548
			2	2,33667	3,16195	,481	-4,9548	9,6281
HSTi	LSD	0	1	1,65667	1,46227	,290	-1,7153	5,0287
			2	-1,94333	1,46227	,221	-5,3153	1,4287
			3	-,38000	1,46227	,802	-3,7520	2,9920
		1	0	-1,65667	1,46227	,290	-5,0287	1,7153
			2	-3,60000	1,46227	,039	-6,9720	-,2280
			3	-2,03667	1,46227	,201	-5,4087	1,3353
		2	0	1,94333	1,46227	,221	-1,4287	5,3153
			1	3,60000	1,46227	,039	,2280	6,9720
			3	1,56333	1,46227	,316	-1,8087	4,9353
		3	0	,38000	1,46227	,802	-2,9920	3,7520
			1	2,03667	1,46227	,201	-1,3353	5,4087
			2	-1,56333	1,46227	,316	-4,9353	1,8087
HSTe	LSD	0	1	3,05000	1,63091	,098	-,7109	6,8109
			2	-2,25333	1,63091	,204	-6,0142	1,5076
			3	,37667	1,63091	,823	-3,3842	4,1376
		1	0	-3,05000	1,63091	,098	-6,8109	,7109
			2	-5,30333	1,63091	,012	-9,0642	-1,5424
			3	-2,67333	1,63091	,140	-6,4342	1,0876
		2	0	2,25333	1,63091	,204	-1,5076	6,0142
			1	5,30333	1,63091	,012	1,5424	9,0642
			3	2,63000	1,63091	,145	-1,1309	6,3909
		3	0	-,37667	1,63091	,823	-4,1376	3,3842
			1	2,67333	1,63091	,140	-1,0876	6,4342
			2	-2,63000	1,63091	,145	-6,3909	1,1309
A_canal	LSD	0	1	11,10333	16,63207	,523	-	49,4569
			2	3,04333	16,63207	,859	27,2503	41,3969
			3	-,51667	16,63207	,976	-	37,8369
							35,3103	-
							38,8703	-
		1	0	-11,10333	16,63207	,523	-	27,2503
			2	-8,06000	16,63207	,641	49,4569	30,2936
							-	-
							46,4136	-

		3	-11,62000	16,63207	,505	-	26,7336
		2	0	-3,04333	16,63207	,859	35,3103
		1	8,06000	16,63207	,641	41,3969	46,4136
		3	-3,56000	16,63207	,836	30,2936	34,7936
		3	0	,51667	16,63207	,976	38,8703
		1	11,62000	16,63207	,505	37,8369	49,9736
		2	3,56000	16,63207	,836	26,7336	41,9136
						34,7936	
P_canal	LSD	0	1	4,18333	8,00474	,615	22,6423
			2	4,76000	8,00474	,569	23,2190
			3	-,52000	8,00474	,950	17,9390
		1	0	-4,18333	8,00474	,615	14,2756
			2	,57667	8,00474	,944	14,2756
			3	-4,70333	8,00474	,573	17,8823
						23,1623	13,7556
		2	0	-4,76000	8,00474	,569	23,2190
			1	-,57667	8,00474	,944	13,6990
			3	-5,28000	8,00474	,528	17,8823
						23,7390	13,1790
		3	0	,52000	8,00474	,950	18,9790
			1	4,70333	8,00474	,573	17,9390
			2	5,28000	8,00474	,528	23,1623
						13,7556	23,7390
						13,1790	
E_cor_d	LSD	0	1	-,650000	,249210	,031	-,07532
			2	-,343333	,249210	,206	1,22468
			3	-,410000	,249210	,139	-,91801
		1	0	,650000	,249210	,031	-,98468
			2	,306667	,249210	,253	,07532
			3	,240000	,249210	,364	1,22468
		2	0	,343333	,249210	,206	-,26801
			1	-,306667	,249210	,253	-,23135
			3	-,066667	,249210	,796	-,88135
		3	0	,410000	,249210	,139	-,64135
			1	-,240000	,249210	,364	-,50801
			2	,066667	,249210	,796	-,16468
						-,81468	,98468
						-,33468	,33468
						-,50801	,64135
E_cor_i	LSD	0	1	-,64000	,42092	,167	-1,6106
			2	,33000	,42092	,456	-,3306
			3	-,05000	,42092	,908	1,3006
		1	0	,64000	,42092	,167	-1,0206
			2	,97000	,42092	,050	-,3306
			3	,59000	,42092	,199	-,0006
						-,3806	1,6106
						-,3806	1,5606

			2	0	-,33000	,42092	,456	-1,3006	,6406
				1	-,97000	,42092	,050	-1,9406	,0006
				3	-,38000	,42092	,393	-1,3506	,5906
			3	0	,05000	,42092	,908	-,9206	1,0206
				1	-,59000	,42092	,199	-1,5606	,3806
				2	,38000	,42092	,393	-,5906	1,3506
8	EH_ad	LSD	0	1	,54667	,63882	,420	-,9639	2,0572
				2	,00667	,63882	,992	-1,5039	1,5172
				3	,03667	,63882	,956	-1,4739	1,5472
			1	0	-,54667	,63882	,420	-2,0572	,9639
				2	-,54000	,57138	,376	-1,8911	,8111
				3	-,51000	,57138	,402	-1,8611	,8411
			2	0	-,00667	,63882	,992	-1,5172	1,5039
				1	,54000	,57138	,376	-,8111	1,8911
				3	,03000	,57138	,960	-1,3211	1,3811
			3	0	-,03667	,63882	,956	-1,5472	1,4739
				1	,51000	,57138	,402	-,8411	1,8611
				2	-,03000	,57138	,960	-1,3811	1,3211
	EH_ai	LSD	0	1	,42667	,78863	,605	-1,4382	2,2915
				2	,62000	,78863	,458	-1,2448	2,4848
				3	-,20333	,78863	,804	-2,0682	1,6615
			1	0	-,42667	,78863	,605	-2,2915	1,4382
				2	,19333	,70538	,792	-1,4746	1,8613
				3	-,63000	,70538	,401	-2,2979	1,0379
			2	0	-,62000	,78863	,458	-2,4848	1,2448
				1	-,19333	,70538	,792	-1,8613	1,4746
				3	-,82333	,70538	,281	-2,4913	,8446
			3	0	,20333	,78863	,804	-1,6615	2,0682
				1	,63000	,70538	,401	-1,0379	2,2979
				2	,82333	,70538	,281	-,8446	2,4913
	EH_bd	LSD	0	1	,32500	,18527	,123	-,1131	,7631
				2	,32500	,18527	,123	-,1131	,7631
				3	,21167	,18527	,291	-,2264	,6498
			1	0	-,32500	,18527	,123	-,7631	,1131
				2	,00000	,16571	1,000	-,3918	,3918
				3	-,11333	,16571	,516	-,5052	,2785
			2	0	-,32500	,18527	,123	-,7631	,1131
				1	,00000	,16571	1,000	-,3918	,3918
				3	-,11333	,16571	,516	-,5052	,2785

		3	0	-,21167	,18527	,291	-,6498	,2264
			1	,11333	,16571	,516	-,2785	,5052
			2	,11333	,16571	,516	-,2785	,5052
EH_bi	LSD	0	1	,37500	,18298	,080	-,0577	,8077
			2	,37500	,18298	,080	-,0577	,8077
			3	,37500	,18298	,080	-,0577	,8077
		1	0	-,37500	,18298	,080	-,8077	,0577
			2	,00000	,16366	1,000	-,3870	,3870
			3	,00000	,16366	1,000	-,3870	,3870
		2	0	-,37500	,18298	,080	-,8077	,0577
			1	,00000	,16366	1,000	-,3870	,3870
			3	,00000	,16366	1,000	-,3870	,3870
		3	0	-,37500	,18298	,080	-,8077	,0577
			1	,00000	,16366	1,000	-,3870	,3870
			2	,00000	,16366	1,000	-,3870	,3870
VSTi	LSD	0	1	,91333	1,22370	,480	-1,9803	3,8069
			2	,00333	1,22370	,998	-2,8903	2,8969
			3	,15667	1,22370	,902	-2,7369	3,0503
		1	0	-,91333	1,22370	,480	-3,8069	1,9803
			2	-,91000	1,09451	,433	-3,4981	1,6781
			3	-,75667	1,09451	,512	-3,3448	1,8314
		2	0	-,00333	1,22370	,998	-2,8969	2,8903
			1	,91000	1,09451	,433	-1,6781	3,4981
			3	,15333	1,09451	,893	-2,4348	2,7414
		3	0	-,15667	1,22370	,902	-3,0503	2,7369
			1	,75667	1,09451	,512	-1,8314	3,3448
			2	-,15333	1,09451	,893	-2,7414	2,4348
VSTe	LSD	0	1	,43167	1,15610	,720	-2,3021	3,1654
			2	-,21167	1,15610	,860	-2,9454	2,5221
			3	,21500	1,15610	,858	-2,5187	2,9487
		1	0	-,43167	1,15610	,720	-3,1654	2,3021
			2	-,64333	1,03405	,554	-3,0885	1,8018
			3	-,21667	1,03405	,840	-2,6618	2,2285
		2	0	,21167	1,15610	,860	-2,5221	2,9454
			1	,64333	1,03405	,554	-1,8018	3,0885
			3	,42667	1,03405	,692	-2,0185	2,8718
		3	0	-,21500	1,15610	,858	-2,9487	2,5187
			1	,21667	1,03405	,840	-2,2285	2,6618
			2	-,42667	1,03405	,692	-2,8718	2,0185

HSTi	LSD	0	1	1,17167	1,49208	,458	-2,3566	4,6999	
			2	,17167	1,49208	,912	-3,3566	3,6999	
			3	,42167	1,49208	,786	-3,1066	3,9499	
	1	0	0	-1,17167	1,49208	,458	-4,6999	2,3566	
			2	-1,00000	1,33456	,478	-4,1557	2,1557	
			3	-,75000	1,33456	,592	-3,9057	2,4057	
	2	0	0	-,17167	1,49208	,912	-3,6999	3,3566	
			1	1,00000	1,33456	,478	-2,1557	4,1557	
			3	,25000	1,33456	,857	-2,9057	3,4057	
	3	0	0	-,42167	1,49208	,786	-3,9499	3,1066	
			1	,75000	1,33456	,592	-2,4057	3,9057	
			2	-,25000	1,33456	,857	-3,4057	2,9057	
HSTe	LSD	0	1	2,18667	2,10245	,333	-2,7848	7,1582	
			2	,91000	2,10245	,678	-4,0615	5,8815	
			3	1,56333	2,10245	,481	-3,4082	6,5348	
	1	0	0	-2,18667	2,10245	,333	-7,1582	2,7848	
			2	-1,27667	1,88049	,519	-5,7233	3,1700	
			3	-,62333	1,88049	,750	-5,0700	3,8233	
	2	0	0	-,91000	2,10245	,678	-5,8815	4,0615	
			1	1,27667	1,88049	,519	-3,1700	5,7233	
			3	,65333	1,88049	,738	-3,7933	5,1000	
	3	0	0	-1,56333	2,10245	,481	-6,5348	3,4082	
			1	,62333	1,88049	,750	-3,8233	5,0700	
			2	-,65333	1,88049	,738	-5,1000	3,7933	
A_canal	LSD	0	1	6,62000	11,93879	,597	-	34,8508	
			2	2,38333	11,93879	,847	21,6108	-	30,6141
			3	3,87333	11,93879	,755	25,8474	-	32,1041
	1	0	0	-6,62000	11,93879	,597	-	24,3574	21,6108
			2	-4,23667	10,67838	,703	34,8508	-	21,0137
			3	-2,74667	10,67838	,804	29,4870	-	22,5037
	2	0	0	-2,38333	11,93879	,847	-	27,9970	25,8474
			1	4,23667	10,67838	,703	30,6141	-	29,4870
			3	1,49000	10,67838	,893	21,0137	-	26,7404
	3	0	0	-3,87333	11,93879	,755	-	23,7604	24,3574
			1	2,74667	10,67838	,804	32,1041	-	27,9970
			2	-1,49000	10,67838	,893	22,5037	-	23,7604
P_canal	LSD	0	1	3,30333	3,79971	,413	-5,6815	12,2882	

		2	,60333	3,79971	,878	-8,3815	9,5882
		3	1,41667	3,79971	,720	-7,5682	10,4015
	1	0	-3,30333	3,79971	,413	-	5,6815
		2	-2,70000	3,39856	,453	12,2882	-
		3	-1,88667	3,39856	,596	10,7363	5,3363
						-9,9230	6,1497
	2	0	-,60333	3,79971	,878	-9,5882	8,3815
		1	2,70000	3,39856	,453	-5,3363	10,7363
		3	,81333	3,39856	,818	-7,2230	8,8497
	3	0	-1,41667	3,79971	,720	-	7,5682
		1	1,88667	3,39856	,596	10,4015	-
		2	-,81333	3,39856	,818	-6,1497	9,9230
						-8,8497	7,2230
E_cor_d	LSD	0					
		1	,156667	,464860	,746	-,94255	1,25589
		2	,363333	,464860	,460	-,73589	1,46255
		3	,383333	,464860	,437	-,71589	1,48255
	1	0	-,156667	,464860	,746	-	,94255
		2	,206667	,415784	,634	1,25589	-
		3	,226667	,415784	,603	-,77651	1,18984
						-7,5651	1,20984
	2	0	-,363333	,464860	,460	-	,73589
		1	-,206667	,415784	,634	1,46255	-
		3	,020000	,415784	,963	-	,77651
						1,18984	-
						-,96317	1,00317
	3	0	-,383333	,464860	,437	-	,71589
		1	-,226667	,415784	,603	1,48255	-
		2	-,020000	,415784	,963	-	,75651
						1,20984	-
						-	,96317
E_cor_i	LSD	0					
		1	-,19833	,68230	,780	-1,8117	1,4150
		2	-,21167	,68230	,765	-1,8250	1,4017
		3	-,08833	,68230	,901	-1,7017	1,5250
	1	0	,19833	,68230	,780	-1,4150	1,8117
		2	-,01333	,61027	,983	-1,4564	1,4297
		3	,11000	,61027	,862	-1,3330	1,5530
	2	0	,21167	,68230	,765	-1,4017	1,8250
		1	,01333	,61027	,983	-1,4297	1,4564
		3	,12333	,61027	,846	-1,3197	1,5664
	3	0	,08833	,68230	,901	-1,5250	1,7017
		1	-,11000	,61027	,862	-1,5530	1,3330
		2	-,12333	,61027	,846	-1,5664	1,3197

Kruskal-Wallis Test

Material Control-7M3T

Test Statistics^{a,b}

Periodo	EH_a d	EH_a i	EH_b d	EH_b i	VSTi	VST e	HSTi	HST e	A_can al	P_can al	E_cor_ d	E_cor_ i
1 Chi-Square df	,196	,429	1,000	1,000	,429	,429	,048	,429	,429	,429	1,190	1,190
Asymp. Sig.	,658	,513	,317	,317	,513	,513	,827	,513	,513	,513	,275	,275
2 Chi-Square df	,441	,048	1,000	,054	,048	,429	2,333	2,333	2,333	2,333	3,857	3,857
Asymp. Sig.	,507	,827	,317	,817	,827	,513	,127	,127	,127	,127	,050	,050
4 Chi-Square df	,051	1,344	1,000	,067	1,190	,429	1,190	1,190	1,190	1,190	3,857	,441
Asymp. Sig.	,822	,246	,317	,796	,275	,513	,275	,275	,275	,275	,050	,507
8 Chi-Square df	1,333	,333	1,500	1,500	,333	,333	,333	1,333	,333	,333	,000	,333
Asymp. Sig.	,248	,564	,221	,221	,564	,564	,564	,248	,564	,564	1,000	,564

Material 7M3T-5V5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo	EH_a d	EH_a i	EH_b d	EH_b i	VSTi	VST e	HSTi	HST e	A_can al	P_can al	E_cor_ d	E_cor_ i
1 Chi-Square df	,429	,429	1,000	1,000	2,333	2,333	,048	1,190	,048	,048	,441	3,971
Asymp. Sig.	,513	,513	,317	,317	,127	,127	,827	,275	,827	,827	,507	,046
2 Chi-Square df	,429	,048	,067	,054	1,190	1,190	1,190	,429	,429	1,190	1,765	1,190
Asymp. Sig.	,513	,827	,796	,817	,275	,275	,275	,513	,513	,275	,184	,275
4 Chi-Square df	3,857	,429	,067	1,000	,429	,429	3,857	3,857	,429	,429	1,765	3,971
Asymp. Sig.	,050	,513	,796	,317	,513	,513	,050	,050	,513	,513	,184	,046
8 Chi-Square df	,429	,000	,000	,000	,429	,429	,048	,048	,429	,429	,048	,048
Asymp. Sig.	,127	,127	,127	,127	,127	,127	,127	,127	,127	,127	,127	,127

Asymp . Sig.	,513	1,000	1,000	1,000	,513	,513	,827	,827	,513	,513	,827	,827
--------------	------	-------	-------	-------	------	------	------	------	------	------	------	------

Material 5V5G-5M5G

Test Statistics^{ab}

Periodo	EH_a d	EH_a i	EH_b d	EH_b i	VSTi	VST e	HSTi	HST e	A_can al	P_can al	E_cor_ d	E_cor_ i
1 Chi-Square df	,429	1,190	1,000	,000	,429	1,190	,048	1,190	,429	,048	,441	1,344
Asymp . Sig.	,513	,275	,317	1,000	,513	,275	,827	,275	,513	,827	,507	,246
2 Chi-Square df	,048	,441	1,344	1,344	1,190	3,857	,429	,429	,429	,429	2,333	2,333
Asymp . Sig.	,827	,507	,246	,246	,275	,050	,513	,513	,513	,513	,127	,127
4 Chi-Square df	,048	1,190	,067	1,000	,429	,429	3,857	3,857	,429	,429	,429	1,344
Asymp . Sig.	,827	,275	,796	,317	,513	,513	,050	,050	,513	,513	,513	,246
8 Chi-Square df	,048	,429	1,000	,000	,429	,048	,048	,048	,048	,429	,441	,000
Asymp . Sig.	,827	,513	,317	1,000	,513	,827	,827	,827	,827	,513	,507	1,000

Material Control-5V5G

Test Statistics^{ab}

Periodo	EH_a d	EH_a i	EH_b d	EH_b i	VSTi	VST e	HSTi	HST e	A_can al	P_can al	E_cor_ d	E_cor_ i
1 Chi-Square df	1,190	1,190	,000	,000	,048	1,190	,048	,048	,429	,429	,054	1,344
Asymp . Sig.	,275	,275	1,000	1,000	,827	,275	,827	,827	,513	,513	,817	,246
2 Chi-Square df	,049	,429	1,000	,067	,429	,048	1,190	2,333	1,190	2,333	,429	,429
Asymp . Sig.	,825	,513	,317	,796	,513	,827	,275	,127	,275	,127	,513	,513

4	Chi-Square	2,333	3,971	1,000	1,000	,048	,048	1,190	1,190	,048	,048	,429	,067
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,127	,046	,317	,317	,827	,827	,275	,275	,827	,827	,513	,796
8	Chi-Square	,000	1,333	1,500	1,500	,000	,000	,333	,333	,000	,000	,333	,333
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	1,000	,248	,221	,221	1,000	1,000	,564	,564	1,000	1,000	,564	,564

Material Control-5M5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		EH_a_d	EH_a_i	EH_b_d	EH_b_i	VSTi	VST_e	HSTi	HST_e	A_canal	P_canal	E_cor_d	E_cor_i
1	Chi-Square	,429	,196	1,000	,000	,048	,048	,048	,429	,048	,429	,048	,196
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,658	,317	1,000	,827	,827	,827	,513	,827	,513	,827	,658
2	Chi-Square	,049	1,225	2,400	,484	,048	,429	,429	1,190	1,190	2,333	3,857	2,333
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,825	,268	,121	,487	,827	,513	,513	,275	,275	,127	,050	,127
4	Chi-Square	2,333	2,402	1,000	,067	,048	,429	,429	,429	,429	,429	1,190	,054
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,127	,121	,317	,796	,827	,513	,513	,513	,513	,513	,275	,817
8	Chi-Square	,333	,000	,417	1,500	,333	,000	,333	1,333	,333	,333	,000	,000
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,564	1,000	,519	,221	,564	1,000	,564	,248	,564	,564	1,000	1,000

Material 7M3T-5M5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		EH_a_d	EH_a_i	EH_b_d	EH_b_i	VSTi	VST_e	HSTi	HST_e	A_canal	P_canal	E_cor_d	E_cor_i
1	Chi-Square	,048	3,857	,067	1,000	1,190	1,190	,048	1,190	1,190	1,190	3,857	,048
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,050	,796	,317	,275	,275	,827	,275	,275	,275	,050	,827
2	Chi-Square	,429	,049	1,344	,784	,429	,784	,048	,048	,048	,048	,048	,048
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,825	,246	,376	,513	,376	,827	,827	,827	,827	,827
4	Chi-Square df	3,857	,048	,067	,000	2,333	,429	3,857	3,857	3,857	3,857	1,190
	Asymp. Sig.	,050	,827	,796	1,000	,127	,513	,050	,050	,050	,050	,275
8	Chi-Square df	,048	,429	1,000	,000	,429	,429	,429	,048	,429	,429	1,225
	Asymp. Sig.	,827	,513	,317	1,000	,513	,513	,513	,827	,513	,513	,268

Histomorfometría Panorámica, estudio por periodos

Materiales: 0 = Control, 1 = 7M3T, 2 = 5V5G, 3 = 5M5G

Test of Homogeneity of Variances

Material	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0 EH_ad	4,014	3	7	,059
EH_ai	,199	3	7	,894
EH_bd	.	3	.	.
EH_bi	7,273	3	7	,015
VSTi	5,080	3	7	,035
VSTe	4,307	3	7	,051
HSTi	8,278	3	7	,011
HSTe	7,038	3	7	,016
A_canal	5,717	3	7	,027
P_canal	6,991	3	7	,016
E_cor_d	3,318	3	7	,087
E_cor_i	2,658	3	7	,129
1 EH_ad	1,913	3	8	,206
EH_ai	1,389	3	8	,315
EH_bd	6,851	3	8	,013
EH_bi	4,307	3	8	,044
VSTi	1,267	3	8	,349
VSTe	1,612	3	8	,262
HSTi	2,266	3	8	,158
HSTe	2,749	3	8	,112
2 EH_ad	5,152	3	8	,028
EH_ai	2,240	3	8	,161
EH_bd	11,693	3	8	,003
EH_bi	16,000	3	8	,001
VSTi	10,527	3	8	,004
VSTe	12,025	3	8	,002
HSTi	3,110	3	8	,089
HSTe	3,735	3	8	,060
A_canal	10,388	3	8	,004
P_canal	11,800	3	8	,003
E_cor_d	4,488	3	8	,040
E_cor_i	4,702	3	8	,036
3 EH_ad	2,884	3	8	,103
EH_ai	2,574	3	8	,127
EH_bd	4,009	3	8	,052
EH_bi	4,153	3	8	,048
VSTi	1,654	3	8	,253
VSTe	2,138	3	8	,174
HSTi	3,732	3	8	,061
HSTe	1,856	3	8	,215

A_canal	,639	3	8	,611	A_canal	3,276	3	8	,080
P_canal	2,749	3	8	,112	P_canal	4,242	3	8	,045
E_cor_d	1,475	3	8	,293	E_cor_d	1,764	3	8	,232
E_cor_i	2,002	3	8	,192	E_cor_i	,731	3	8	,562

ANOVA

Material		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
0 EH_ad	Between Groups	,824	3	,275	,496	,697
	Within Groups	3,881	7	,554		
	Total	4,705	10			
EH_ai	Between Groups	6,668	3	2,223	4,231	,053
	Within Groups	3,677	7	,525		
	Total	10,345	10			
EH_bd	Between Groups	,173	3	,058	1,909	,217
	Within Groups	,211	7	,030		
	Total	,384	10			
EH_bi	Between Groups	,834	3	,278	,418	,746
	Within Groups	4,655	7	,665		
	Total	5,489	10			
VSTi	Between Groups	4,757	3	1,586	,139	,933
	Within Groups	79,682	7	11,383		
	Total	84,440	10			
VSTe	Between Groups	27,447	3	9,149	,528	,677
	Within Groups	121,297	7	17,328		
	Total	148,744	10			
HSTi	Between Groups	16,024	3	5,341	,448	,726
	Within Groups	83,434	7	11,919		
	Total	99,458	10			
HSTe	Between Groups	39,805	3	13,268	,605	,633
	Within Groups	153,632	7	21,947		
	Total	193,437	10			
A_canal	Between Groups	383,365	3	127,788	,260	,852

	Within Groups	3443,126	7	491,875			
	Total	3826,491	10				
P_canal	Between Groups	141,643	3	47,214	,404	,755	
	Within Groups	817,785	7	116,826			
	Total	959,427	10				
E_cor_d	Between Groups	,612	3	,204	,805	,530	
	Within Groups	1,775	7	,254			
	Total	2,387	10				
E_cor_i	Between Groups	,161	3	,054	,138	,934	
	Within Groups	2,719	7	,388			
	Total	2,880	10				
1	EH_ad	Between Groups	2,268	3	,756	,815	,521
		Within Groups	7,418	8	,927		
		Total	9,687	11			
	EH_ai	Between Groups	1,432	3	,477	,483	,703
		Within Groups	7,912	8	,989		
		Total	9,344	11			
	EH_bd	Between Groups	,142	3	,047	,428	,738
		Within Groups	,886	8	,111		
		Total	1,029	11			
	EH_bi	Between Groups	,236	3	,079	,506	,689
		Within Groups	1,244	8	,155		
		Total	1,480	11			
	VSTi	Between Groups	3,414	3	1,138	,438	,732
		Within Groups	20,789	8	2,599		
		Total	24,203	11			
	VSTe	Between Groups	11,272	3	3,757	1,908	,207
		Within Groups	15,754	8	1,969		
		Total	27,026	11			
	HSTi	Between Groups	8,173	3	2,724	,250	,859
		Within Groups	87,184	8	10,898		
		Total	95,357	11			
	HSTe	Between Groups	26,542	3	8,847	,504	,690

	Within Groups	140,304	8	17,538			
	Total	166,845	11				
A_canal	Between Groups	296,040	3	98,680	,232	,872	
	Within Groups	3402,227	8	425,278			
	Total	3698,268	11				
P_canal	Between Groups	79,152	3	26,384	,292	,830	
	Within Groups	723,265	8	90,408			
	Total	802,418	11				
E_cor_d	Between Groups	,035	3	,012	,441	,730	
	Within Groups	,211	8	,026			
	Total	,246	11				
E_cor_i	Between Groups	,061	3	,020	,289	,832	
	Within Groups	,567	8	,071			
	Total	,628	11				
2	EH_ad	Between Groups	1,161	3	,387	,389	,764
		Within Groups	7,954	8	,994		
		Total	9,115	11			
	EH_ai	Between Groups	2,140	3	,713	,900	,482
		Within Groups	6,340	8	,793		
		Total	8,480	11			
	EH_bd	Between Groups	,353	3	,118	,731	,562
		Within Groups	1,290	8	,161		
		Total	1,643	11			
	EH_bi	Between Groups	,216	3	,072	1,000	,441
		Within Groups	,577	8	,072		
		Total	,793	11			
	VSTi	Between Groups	11,779	3	3,926	,536	,670
		Within Groups	58,565	8	7,321		
		Total	70,344	11			
	VSTe	Between Groups	28,244	3	9,415	,673	,592
		Within Groups	111,893	8	13,987		
		Total	140,137	11			

HSTi	Between Groups	4,168	3	1,389	,833	,512
	Within Groups	13,342	8	1,668		
	Total	17,510	11			
HSTe	Between Groups	12,160	3	4,053	1,037	,427
	Within Groups	31,268	8	3,908		
	Total	43,427	11			
A_canal	Between Groups	193,532	3	64,511	,219	,881
	Within Groups	2359,899	8	294,987		
	Total	2553,431	11			
P_canal	Between Groups	107,866	3	35,955	,462	,717
	Within Groups	622,643	8	77,830		
	Total	730,509	11			
E_cor_d	Between Groups	,291	3	,097	,295	,828
	Within Groups	2,629	8	,329		
	Total	2,920	11			
E_cor_i	Between Groups	1,662	3	,554	2,094	,179
	Within Groups	2,117	8	,265		
	Total	3,779	11			
3 EH_ad	Between Groups	1,084	3	,361	,534	,672
	Within Groups	5,408	8	,676		
	Total	6,492	11			
EH_ai	Between Groups	2,094	3	,698	2,447	,139
	Within Groups	2,281	8	,285		
	Total	4,375	11			
EH_bd	Between Groups	1,931	3	,644	,652	,604
	Within Groups	7,895	8	,987		
	Total	9,826	11			
EH_bi	Between Groups	2,037	3	,679	2,328	,151
	Within Groups	2,334	8	,292		
	Total	4,371	11			
VSTi	Between Groups	,386	3	,129	,110	,952
	Within Groups					

	Within Groups	9,389	8	1,174		
	Total	9,775	11			
VSTe	Between Groups	2,328	3	,776	,905	,480
	Within Groups	6,860	8	,857		
	Total	9,188	11			
HSTi	Between Groups	,937	3	,312	,232	,872
	Within Groups	10,769	8	1,346		
	Total	11,706	11			
HSTe	Between Groups	4,055	3	1,352	,367	,779
	Within Groups	29,461	8	3,683		
	Total	33,516	11			
A_canal	Between Groups	39,265	3	13,088	,102	,956
	Within Groups	1024,229	8	128,029		
	Total	1063,495	11			
P_canal	Between Groups	1,709	3	,570	,044	,987
	Within Groups	103,060	8	12,883		
	Total	104,769	11			
E_cor_d	Between Groups	,225	3	,075	1,526	,281
	Within Groups	,394	8	,049		
	Total	,619	11			
E_cor_i	Between Groups	,531	3	,177	,435	,734
	Within Groups	3,259	8	,407		
	Total	3,791	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Material	Dependent Variable	(I) Periodo	(J) Periodo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
							Lower Bound	Upper Bound	
0	EH_ad	LSD	1	2	-,43333	,60797	,499	-1,8710	1,0043
				4	,20000	,60797	,752	-1,2376	1,6376
				8	-,42333	,67974	,553	-2,0307	1,1840
			2	1	,43333	,60797	,499	-1,0043	1,8710

			4		,63333	,60797	,332	-,8043	2,0710
			8		,01000	,67974	,989	-1,5973	1,6173
		4	1		-20000	,60797	,752	-1,6376	1,2376
			2		-63333	,60797	,332	-2,0710	,8043
			8		-,62333	,67974	,390	-2,2307	,9840
		8	1		,42333	,67974	,553	-1,1840	2,0307
			2		-,01000	,67974	,989	-1,6173	1,5973
			4		,62333	,67974	,390	-,9840	2,2307
EH_ai	LSD	1	2		-1,47333	,59180	,042	-2,8727	-,0739
			4		,53000	,59180	,400	-,8694	1,9294
			8		-,66667	,66165	,347	-2,2312	,8979
		2	1		1,47333	,59180	,042	,0739	2,8727
			4		2,00333	,59180	,012	,6039	3,4027
			8		,80667	,66165	,262	-,7579	2,3712
		4	1		-,53000	,59180	,400	-1,9294	,8694
			2		-2,00333	,59180	,012	-3,4027	-,6039
			8		-1,19667	,66165	,113	-2,7612	,3679
		8	1		,66667	,66165	,347	-,8979	2,2312
			2		-,80667	,66165	,262	-2,3712	,7579
			4		1,19667	,66165	,113	-,3679	2,7612
EH_bd	LSD	1	2		,00000	,14184	1,000	-,3354	,3354
			4		,00000	,14184	1,000	-,3354	,3354
			8		-,32500	,15858	,080	-,7000	,0500
		2	1		,00000	,14184	1,000	-,3354	,3354
			4		,00000	,14184	1,000	-,3354	,3354
			8		-,32500	,15858	,080	-,7000	,0500
		4	1		,00000	,14184	1,000	-,3354	,3354
			2		,00000	,14184	1,000	-,3354	,3354
			8		-,32500	,15858	,080	-,7000	,0500
		8	1		,32500	,15858	,080	-,0500	,7000
			2		,32500	,15858	,080	-,0500	,7000
			4		,32500	,15858	,080	-,0500	,7000
EH_bi	LSD	1	2		-,42000	,66583	,548	-1,9944	1,1544
			4		-,74333	,66583	,301	-2,3178	,8311
			8		-,37500	,74442	,630	-2,1353	1,3853
		2	1		,42000	,66583	,548	-1,1544	1,9944
			4		-,32333	,66583	,642	-1,8978	1,2511
			8		,04500	,74442	,953	-1,7153	1,8053

			4	1	,74333	,66583	,301	-,8311	2,3178
				2	,32333	,66583	,642	-1,2511	1,8978
				8	,36833	,74442	,636	-1,3919	2,1286
			8	1	,37500	,74442	,630	-1,3853	2,1353
				2	-,04500	,74442	,953	-1,8053	1,7153
				4	-,36833	,74442	,636	-2,1286	1,3919
VSTi	LSD	1	2	2	-1,53000	2,75477	,596	-8,0440	4,9840
				4	-,93000	2,75477	,746	-7,4440	5,5840
				8	-1,67333	3,07993	,604	-8,9562	5,6095
			2	1	1,53000	2,75477	,596	-4,9840	8,0440
				4	,60000	2,75477	,834	-5,9140	7,1140
				8	-,14333	3,07993	,964	-7,4262	7,1395
			4	1	,93000	2,75477	,746	-5,5840	7,4440
				2	-,60000	2,75477	,834	-7,1140	5,9140
				8	-,74333	3,07993	,816	-8,0262	6,5395
			8	1	1,67333	3,07993	,604	-5,6095	8,9562
				2	,14333	3,07993	,964	-7,1395	7,4262
				4	,74333	3,07993	,816	-6,5395	8,0262
VSTe	LSD	1	2	2	-3,37667	3,39884	,354	-	4,6603
				4	-3,41000	3,39884	,349	11,4137	4,6270
				8	-3,90500	3,80002	,338	11,4470	5,0806
								12,8906	
			2	1	3,37667	3,39884	,354	-4,6603	11,4137
				4	-,03333	3,39884	,992	-8,0703	8,0037
				8	-,52833	3,80002	,893	-9,5140	8,4573
			4	1	3,41000	3,39884	,349	-4,6270	11,4470
				2	,03333	3,39884	,992	-8,0037	8,0703
				8	-,49500	3,80002	,900	-9,4806	8,4906
			8	1	3,90500	3,80002	,338	-5,0806	12,8906
				2	,52833	3,80002	,893	-8,4573	9,5140
				4	,49500	3,80002	,900	-8,4906	9,4806
HSTi	LSD	1	2	2	-3,14333	2,81888	,302	-9,8089	3,5223
				4	-1,29667	2,81888	,659	-7,9623	5,3689
				8	-2,28167	3,15161	,493	-9,7340	5,1707
			2	1	3,14333	2,81888	,302	-3,5223	9,8089
				4	1,84667	2,81888	,533	-4,8189	8,5123
				8	,86167	3,15161	,792	-6,5907	8,3140
			4	1	1,29667	2,81888	,659	-5,3689	7,9623
				2	-1,84667	2,81888	,533	-8,5123	4,8189

			8		-,98500	3,15161	,764	-8,4374	6,4674
		8	1		2,28167	3,15161	,493	-5,1707	9,7340
			2		-,86167	3,15161	,792	-8,3140	6,5907
			4		,98500	3,15161	,764	-6,4674	8,4374
HSTe	LSD	1	2		-4,63333	3,82513	,265	-	4,4117
			4		-1,95333	3,82513	,625	13,6783	7,0917
			8		-4,31333	4,27662	,347	10,9983	5,7993
								14,4259	
		2	1		4,63333	3,82513	,265	-4,4117	13,6783
			4		2,68000	3,82513	,506	-6,3650	11,7250
			8		,32000	4,27662	,942	-9,7926	10,4326
		4	1		1,95333	3,82513	,625	-7,0917	10,9983
			2		-2,68000	3,82513	,506	-	6,3650
			8		-2,36000	4,27662	,598	11,7250	7,7526
								12,4726	
		8	1		4,31333	4,27662	,347	-5,7993	14,4259
			2		-,32000	4,27662	,942	-	9,7926
			4		2,36000	4,27662	,598	10,4326	12,4726
								-7,7526	
A_canal	LSD	1	2		-13,87000	18,10847	,469	-	28,9497
			4		-,18667	18,10847	,992	56,6897	42,6331
			8		-6,19333	20,24589	,769	43,0064	41,6806
								54,0672	
		2	1		13,87000	18,10847	,469	-	56,6897
			4		13,68333	18,10847	,475	28,9497	56,5031
			8		7,67667	20,24589	,716	29,1364	55,5506
								40,1972	
		4	1		,18667	18,10847	,992	-	43,0064
			2		-13,68333	18,10847	,475	42,6331	29,1364
			8		-6,00667	20,24589	,775	56,5031	41,8672
								53,8806	
		8	1		6,19333	20,24589	,769	-	54,0672
			2		-7,67667	20,24589	,716	41,6806	40,1972
			4		6,00667	20,24589	,775	55,5506	53,8806
								41,8672	
P_canal	LSD	1	2		-9,46667	8,82521	,319	-	11,4016
			4		-3,41333	8,82521	,710	30,3350	17,4550
			8		-5,80333	9,86688	,575	24,2816	17,5281
								29,1348	
		2	1		9,46667	8,82521	,319	-	30,3350
			4		6,05333	8,82521	,515	11,4016	26,9216
			8		3,66333	9,86688	,721	14,8150	26,9948
								19,6681	
		4	1		3,41333	8,82521	,710	-	24,2816
								17,4550	

			2	-6,05333	8,82521	,515	-	14,8150	
			8	-2,39000	9,86688	,816	26,9216	20,9415	
			8	5,80333	9,86688	,575	-	29,1348	
			2	-3,66333	9,86688	,721	17,5281	19,6681	
			4	2,39000	9,86688	,816	26,9948	25,7215	
							20,9415		
E_cor_d	LSD	1	2	-,193333	,411100	,652	1,16543	,77876	
			4	,046667	,411100	,913	-,92543	1,01876	
			8	-,610000	,459624	,226	-	,47684	
							1,69684		
			2	,193333	,411100	,652	-,77876	1,16543	
			4	,240000	,411100	,578	-,73210	1,21210	
			8	-,416667	,459624	,395	-	,67017	
							1,50350		
			4	-,046667	,411100	,913	-	,92543	
			2	-,240000	,411100	,578	1,01876	,73210	
			8	-,656667	,459624	,196	1,21210	,43017	
							1,74350		
			8	,610000	,459624	,226	-,47684	1,69684	
			2	,416667	,459624	,395	-,67017	1,50350	
			4	,656667	,459624	,196	-,43017	1,74350	
E_cor_i	LSD	1	2	-,14333	,50891	,786	-1,3467	1,0600	
			4	,12333	,50891	,815	-1,0800	1,3267	
			8	-,18833	,56898	,750	-1,5338	1,1571	
			2	,14333	,50891	,786	-1,0600	1,3467	
			4	,26667	,50891	,616	-,9367	1,4700	
			8	-,04500	,56898	,939	-1,3904	1,3004	
			4	-,12333	,50891	,815	-1,3267	1,0800	
			2	-,26667	,50891	,616	-1,4700	,9367	
			8	-,31167	,56898	,601	-1,6571	1,0338	
			8	,18833	,56898	,750	-1,1571	1,5338	
			2	,04500	,56898	,939	-1,3004	1,3904	
			4	,31167	,56898	,601	-1,0338	1,6571	
1	EH_ad	LSD	1	2	-,17000	,78626	,834	-1,9831	1,6431
				4	,91000	,78626	,281	-,9031	2,7231
				8	,57667	,78626	,484	-1,2365	2,3898
			2	,17000	,78626	,834	-1,6431	1,9831	
				4	1,08000	,78626	,207	-,7331	2,8931
				8	,74667	,78626	,370	-1,0665	2,5598
			4	1	-,91000	,78626	,281	-2,7231	,9031
				2	-1,08000	,78626	,207	-2,8931	,7331

			8		-,33333	,78626	,683	-2,1465	1,4798
			8	1	-,57667	,78626	,484	-2,3898	1,2365
				2	-,74667	,78626	,370	-2,5598	1,0665
				4	,33333	,78626	,683	-1,4798	2,1465
EH_ai	LSD	1		2	-,76333	,81198	,375	-2,6358	1,1091
				4	,01000	,81198	,990	-1,8624	1,8824
				8	,08333	,81198	,921	-1,7891	1,9558
			2		,76333	,81198	,375	-1,1091	2,6358
				4	,77333	,81198	,369	-1,0991	2,6458
				8	,84667	,81198	,328	-1,0258	2,7191
			4		-,01000	,81198	,990	-1,8824	1,8624
				2	-,77333	,81198	,369	-2,6458	1,0991
				8	,07333	,81198	,930	-1,7991	1,9458
			8		-,08333	,81198	,921	-1,9558	1,7891
				2	-,84667	,81198	,328	-2,7191	1,0258
				4	-,07333	,81198	,930	-1,9458	1,7991
EH_bd	LSD	1		2	-,16667	,27176	,557	-,7934	,4600
				4	-,09667	,27176	,731	-,7234	,5300
				8	,12333	,27176	,662	-,5034	,7500
			2		,16667	,27176	,557	-,4600	,7934
				4	,07000	,27176	,803	-,5567	,6967
				8	,29000	,27176	,317	-,3367	,9167
			4		,09667	,27176	,731	-,5300	,7234
				2	-,07000	,27176	,803	-,6967	,5567
				8	,22000	,27176	,442	-,4067	,8467
			8		-,12333	,27176	,662	-,7500	,5034
				2	-,29000	,27176	,317	-,9167	,3367
				4	-,22000	,27176	,442	-,8467	,4067
EH_bi	LSD	1		2	-,06000	,32195	,857	-,8024	,6824
				4	,04000	,32195	,904	-,7024	,7824
				8	,30667	,32195	,369	-,4357	1,0491
			2		,06000	,32195	,857	-,6824	,8024
				4	,10000	,32195	,764	-,6424	,8424
				8	,36667	,32195	,288	-,3757	1,1091
			4		-,04000	,32195	,904	-,7824	,7024
				2	-,10000	,32195	,764	-,8424	,6424
				8	,26667	,32195	,432	-,4757	1,0091
			8		-,30667	,32195	,369	-1,0491	,4357

			2	- ,36667	,32195	,288	-1,1091	,3757
			4	- ,26667	,32195	,432	-1,0091	,4757
VSTi	LSD	1	2	-1,09333	1,31622	,430	-4,1285	1,9419
			4	,28667	1,31622	,833	-2,7485	3,3219
			8	- ,59000	1,31622	,666	-3,6252	2,4452
		2	1	1,09333	1,31622	,430	-1,9419	4,1285
			4	1,38000	1,31622	,325	-1,6552	4,4152
			8	,50333	1,31622	,712	-2,5319	3,5385
		4	1	- ,28667	1,31622	,833	-3,3219	2,7485
			2	-1,38000	1,31622	,325	-4,4152	1,6552
			8	- ,87667	1,31622	,524	-3,9119	2,1585
		8	1	,59000	1,31622	,666	-2,4452	3,6252
			2	- ,50333	1,31622	,712	-3,5385	2,5319
			4	,87667	1,31622	,524	-2,1585	3,9119
VSTe	LSD	1	2	-2,40333	1,14577	,069	-5,0455	,2388
			4	-1,20667	1,14577	,323	-3,8488	1,4355
			8	-2,28000	1,14577	,082	-4,9222	,3622
		2	1	2,40333	1,14577	,069	- ,2388	5,0455
			4	1,19667	1,14577	,327	-1,4455	3,8388
			8	,12333	1,14577	,917	-2,5188	2,7655
		4	1	1,20667	1,14577	,323	-1,4355	3,8488
			2	-1,19667	1,14577	,327	-3,8388	1,4455
			8	-1,07333	1,14577	,376	-3,7155	1,5688
		8	1	2,28000	1,14577	,082	- ,3622	4,9222
			2	- ,12333	1,14577	,917	-2,7655	2,5188
			4	1,07333	1,14577	,376	-1,5688	3,7155
HSTi	LSD	1	2	1,80333	2,69543	,522	-4,4123	8,0190
			4	1,50333	2,69543	,592	-4,7123	7,7190
			8	,03333	2,69543	,990	-6,1823	6,2490
		2	1	-1,80333	2,69543	,522	-8,0190	4,4123
			4	- ,30000	2,69543	,914	-6,5157	5,9157
			8	-1,77000	2,69543	,530	-7,9857	4,4457
		4	1	-1,50333	2,69543	,592	-7,7190	4,7123
			2	,30000	2,69543	,914	-5,9157	6,5157
			8	-1,47000	2,69543	,600	-7,6857	4,7457
		8	1	- ,03333	2,69543	,990	-6,2490	6,1823
			2	1,77000	2,69543	,530	-4,4457	7,9857
			4	1,47000	2,69543	,600	-4,7457	7,6857

HSTe	LSD	1	2	2,59667	3,41936	,469	-5,2884	10,4817	
			4	2,38000	3,41936	,506	-5,5050	10,2650	
			8	-,84333	3,41936	,811	-8,7284	7,0417	
		2	1	-2,59667	3,41936	,469	-	5,2884	
			4	-,21667	3,41936	,951	10,4817	-8,1017	7,6684
			8	-3,44000	3,41936	,344	-	4,4450	
		4	1	-2,38000	3,41936	,506	-	5,5050	
			2	,21667	3,41936	,951	10,2650	-7,6684	8,1017
			8	-3,22333	3,41936	,373	-	4,6617	
		8	1	,84333	3,41936	,811	-7,0417	8,7284	
			2	3,44000	3,41936	,344	-4,4450	11,3250	
			4	3,22333	3,41936	,373	-4,6617	11,1084	
A_canal	LSD	1	2	9,19000	16,83802	,600	-	48,0185	
			4	8,64333	16,83802	,622	29,6385	-	47,4719
			8	-1,84667	16,83802	,915	30,1852	-	36,9819
		2	1	-9,19000	16,83802	,600	-	29,6385	
			4	-,54667	16,83802	,975	48,0185	-	38,2819
			8	-11,03667	16,83802	,531	39,3752	-	27,7919
		4	1	-8,64333	16,83802	,622	-	30,1852	
			2	,54667	16,83802	,975	47,4719	-	39,3752
			8	-10,49000	16,83802	,551	38,2819	-	28,3385
		8	1	1,84667	16,83802	,915	-	40,6752	
			2	11,03667	16,83802	,531	36,9819	-	49,8652
			4	10,49000	16,83802	,551	27,7919	-	49,3185
P_canal	LSD	1	2	6,11000	7,76351	,454	-	24,0127	
			4	3,15000	7,76351	,696	11,7927	-	21,0527
			8	-,12000	7,76351	,988	14,7527	-	17,7827
		2	1	-6,11000	7,76351	,454	-	11,7927	
			4	-2,96000	7,76351	,713	24,0127	-	14,9427
			8	-6,23000	7,76351	,445	20,8627	-	11,6727
		4	1	-3,15000	7,76351	,696	-	14,7527	
			2	2,96000	7,76351	,713	21,0527	-	20,8627
			8	-3,27000	7,76351	,685	14,9427	-	14,6327
		8	1	,12000	7,76351	,988	21,1727	-	18,0227
			2	6,23000	7,76351	,445	17,7827	-	24,1327
									11,6727

			4	,11000	,72689	,883	-1,5662	1,7862
			8	,94000	,72689	,232	-,7362	2,6162
		2	1	,14667	,72689	,845	-1,5295	1,8229
			4	,25667	,72689	,733	-1,4195	1,9329
			8	1,08667	,72689	,173	-,5895	2,7629
		4	1	-,11000	,72689	,883	-1,7862	1,5662
			2	-,25667	,72689	,733	-1,9329	1,4195
			8	,83000	,72689	,287	-,8462	2,5062
		8	1	-,94000	,72689	,232	-2,6162	,7362
			2	-1,08667	,72689	,173	-2,7629	,5895
			4	-,83000	,72689	,287	-2,5062	,8462
EH_bd	LSD	1	2	-,21000	,32783	,540	-,9660	,5460
			4	-,41333	,32783	,243	-1,1693	,3426
			8	,00000	,32783	1,000	-,7560	,7560
		2	1	,21000	,32783	,540	-,5460	,9660
			4	-,20333	,32783	,552	-,9593	,5526
			8	,21000	,32783	,540	-,5460	,9660
		4	1	,41333	,32783	,243	-,3426	1,1693
			2	,20333	,32783	,552	-,5526	,9593
			8	,41333	,32783	,243	-,3426	1,1693
		8	1	,00000	,32783	1,000	-,7560	,7560
			2	-,21000	,32783	,540	-,9660	,5460
			4	-,41333	,32783	,243	-1,1693	,3426
EH_bi	LSD	1	2	-,31000	,21920	,195	-,8155	,1955
			4	,00000	,21920	1,000	-,5055	,5055
			8	,00000	,21920	1,000	-,5055	,5055
		2	1	,31000	,21920	,195	-,1955	,8155
			4	,31000	,21920	,195	-,1955	,8155
			8	,31000	,21920	,195	-,1955	,8155
		4	1	,00000	,21920	1,000	-,5055	,5055
			2	-,31000	,21920	,195	-,8155	,1955
			8	,00000	,21920	1,000	-,5055	,5055
		8	1	,00000	,21920	1,000	-,5055	,5055
			2	-,31000	,21920	,195	-,8155	,1955
			4	,00000	,21920	1,000	-,5055	,5055
VSTi	LSD	1	2	-,36000	2,20917	,875	-5,4544	4,7344
			4	2,13000	2,20917	,363	-2,9644	7,2244
			8	-,04667	2,20917	,984	-5,1410	5,0477

		2	1	,36000	2,20917	,875	-4,7344	5,4544
			4	2,49000	2,20917	,292	-2,6044	7,5844
			8	,31333	2,20917	,891	-4,7810	5,4077
		4	1	-2,13000	2,20917	,363	-7,2244	2,9644
			2	-2,49000	2,20917	,292	-7,5844	2,6044
			8	-2,17667	2,20917	,353	-7,2710	2,9177
		8	1	,04667	2,20917	,984	-5,0477	5,1410
			2	-,31333	2,20917	,891	-5,4077	4,7810
			4	2,17667	2,20917	,353	-2,9177	7,2710
VSTe	LSD	1	2	,00333	3,05360	,999	-7,0383	7,0449
			4	3,57000	3,05360	,276	-3,4716	10,6116
			8	,08000	3,05360	,980	-6,9616	7,1216
		2	1	-,00333	3,05360	,999	-7,0449	7,0383
			4	3,56667	3,05360	,276	-3,4749	10,6083
			8	,07667	3,05360	,981	-6,9649	7,1183
		4	1	-3,57000	3,05360	,276	-	3,4716
			2	-3,56667	3,05360	,276	10,6116	-
			8	-3,49000	3,05360	,286	10,6083	-
							10,5316	3,5516
		8	1	-,08000	3,05360	,980	-7,1216	6,9616
			2	-,07667	3,05360	,981	-7,1183	6,9649
			4	3,49000	3,05360	,286	-3,5516	10,5316
HSTi	LSD	1	2	-,54333	1,05443	,620	-2,9748	1,8882
			4	-1,61333	1,05443	,165	-4,0448	,8182
			8	-,48333	1,05443	,659	-2,9148	1,9482
		2	1	,54333	1,05443	,620	-1,8882	2,9748
			4	-1,07000	1,05443	,340	-3,5015	1,3615
			8	,06000	1,05443	,956	-2,3715	2,4915
		4	1	1,61333	1,05443	,165	-,8182	4,0448
			2	1,07000	1,05443	,340	-1,3615	3,5015
			8	1,13000	1,05443	,315	-1,3015	3,5615
		8	1	,48333	1,05443	,659	-1,9482	2,9148
			2	-,06000	1,05443	,956	-2,4915	2,3715
			4	-1,13000	1,05443	,315	-3,5615	1,3015
HSTe	LSD	1	2	2,70333	1,61420	,133	-1,0190	6,4257
			4	1,22667	1,61420	,469	-2,4957	4,9490
			8	2,03000	1,61420	,244	-1,6924	5,7524
		2	1	-2,70333	1,61420	,133	-6,4257	1,0190
			4	-1,47667	1,61420	,387	-5,1990	2,2457

			8		-,67333	1,61420	,688	-4,3957	3,0490
		4	1		-1,22667	1,61420	,469	-4,9490	2,4957
			2		1,47667	1,61420	,387	-2,2457	5,1990
			8		,80333	1,61420	,632	-2,9190	4,5257
		8	1		-2,03000	1,61420	,244	-5,7524	1,6924
			2		,67333	1,61420	,688	-3,0490	4,3957
			4		-,80333	1,61420	,632	-4,5257	2,9190
A_canal	LSD	1	2		-4,31333	14,02349	,766	-	28,0249
			4		6,92000	14,02349	,635	36,6516	-
			8		,25333	14,02349	,986	25,4182	-
								32,0849	-
		2	1		4,31333	14,02349	,766	-	36,6516
			4		11,23333	14,02349	,446	28,0249	-
			8		4,56667	14,02349	,753	21,1049	-
								27,7716	-
		4	1		-6,92000	14,02349	,635	-	25,4182
			2		-11,23333	14,02349	,446	39,2582	-
			8		-6,66667	14,02349	,647	43,5716	-
								39,0049	-
		8	1		-,25333	14,02349	,986	-	32,0849
			2		-4,56667	14,02349	,753	32,5916	-
			4		6,66667	14,02349	,647	36,9049	-
								25,6716	-
P_canal	LSD	1	2		-1,79000	7,20326	,810	-	14,8207
			4		5,97333	7,20326	,431	18,4007	-
			8		-,57333	7,20326	,939	10,6374	-
								17,1841	-
		2	1		1,79000	7,20326	,810	-	18,4007
			4		7,76333	7,20326	,313	14,8207	-
			8		1,21667	7,20326	,870	-8,8474	24,3741
								-	17,8274
								15,3941	-
		4	1		-5,97333	7,20326	,431	-	10,6374
			2		-7,76333	7,20326	,313	22,5841	-
			8		-6,54667	7,20326	,390	24,3741	-
								-	10,0641
								23,1574	-
		8	1		,57333	7,20326	,939	-	17,1841
			2		-1,21667	7,20326	,870	16,0374	-
			4		6,54667	7,20326	,390	17,8274	-
								-	23,1574
								10,0641	-
E_cor_d	LSD	1	2		-,340000	,468034	,488	-	,73929
			4		-,390000	,468034	,429	1,41929	-
			8		-,340000	,468034	,488	-	,68929
								1,46929	-
								-	,73929
								1,41929	-
		2	1		,340000	,468034	,488	-7,3929	1,41929

			4		-,050000	,468034	,918	-	1,02929
			8		,000000	,468034	1,000	1,12929	1,07929
			4	1	,390000	,468034	,429	-,68929	1,46929
			2		,050000	,468034	,918	-	1,12929
			8		,050000	,468034	,918	1,02929	1,12929
			8	1	,340000	,468034	,488	-,73929	1,41929
			2		,000000	,468034	1,000	-	1,07929
			4		-,050000	,468034	,918	1,07929	1,02929
								1,12929	
	E_cor_i	LSD	1	2	-,60667	,41998	,187	-,5751	,3618
				4	,04667	,41998	,914	-,9218	1,0151
				8	-,80667	,41998	,091	-,17751	,1618
			2	1	,60667	,41998	,187	-,3618	1,5751
				4	,65333	,41998	,158	-,3151	1,6218
				8	-,20000	,41998	,647	-,11685	,7685
			4	1	-,04667	,41998	,914	-,10151	,9218
				2	-,65333	,41998	,158	-,16218	,3151
				8	-,85333	,41998	,077	-,18218	,1151
			8	1	,80667	,41998	,091	-,1618	1,7751
				2	,20000	,41998	,647	-,7685	1,1685
				4	,85333	,41998	,077	-,1151	1,8218
3	EH_ad	LSD	1	2	-,51333	,67133	,466	-,20614	1,0348
				4	-,82000	,67133	,257	-,23681	,7281
				8	-,29000	,67133	,677	-,18381	1,2581
			2	1	,51333	,67133	,466	-,10348	2,0614
				4	-,30667	,67133	,660	-,18548	1,2414
				8	,22333	,67133	,748	-,13248	1,7714
			4	1	,82000	,67133	,257	-,7281	2,3681
				2	,30667	,67133	,660	-,12414	1,8548
				8	,53000	,67133	,453	-,10181	2,0781
			8	1	,29000	,67133	,677	-,12581	1,8381
				2	-,22333	,67133	,748	-,17714	1,3248
				4	-,53000	,67133	,453	-,20781	1,0181
	EH_ai	LSD	1	2	-,84333	,43601	,089	-,18488	,1621
				4	-,50333	,43601	,282	-,15088	,5021
				8	-,12000	,43601	,033	-,21254	-,1146
			2	1	,84333	,43601	,089	-,1621	1,8488
				4	,34000	,43601	,458	-,6654	1,3454

			8		-,27667	,43601	,543	-1,2821	,7288
		4	1		,50333	,43601	,282	-,5021	1,5088
			2		-,34000	,43601	,458	-1,3454	,6654
			8		-,61667	,43601	,195	-1,6221	,3888
		8	1		1,12000	,43601	,033	,1146	2,1254
			2		,27667	,43601	,543	-,7288	1,2821
			4		,61667	,43601	,195	-,3888	1,6221
EH_bd	LSD	1	2		-,69333	,81112	,418	-2,5638	1,1771
			4		-,30333	,81112	,718	-2,1738	1,5671
			8		,40000	,81112	,635	-1,4705	2,2705
		2	1		,69333	,81112	,418	-1,1771	2,5638
			4		,39000	,81112	,644	-1,4805	2,2605
			8		1,09333	,81112	,215	-,7771	2,9638
		4	1		,30333	,81112	,718	-1,5671	2,1738
			2		-,39000	,81112	,644	-2,2605	1,4805
			8		,70333	,81112	,411	-1,1671	2,5738
		8	1		-,40000	,81112	,635	-2,2705	1,4705
			2		-1,09333	,81112	,215	-2,9638	,7771
			4		-,70333	,81112	,411	-2,5738	1,1671
EH_bi	LSD	1	2		-1,00667	,44102	,052	-2,0236	,0103
			4		-,26667	,44102	,562	-1,2836	,7503
			8		,00000	,44102	1,000	-1,0170	1,0170
		2	1		1,00667	,44102	,052	-,0103	2,0236
			4		,74000	,44102	,132	-,2770	1,7570
			8		1,00667	,44102	,052	-,0103	2,0236
		4	1		,26667	,44102	,562	-,7503	1,2836
			2		-,74000	,44102	,132	-1,7570	,2770
			8		,26667	,44102	,562	-,7503	1,2836
		8	1		,00000	,44102	1,000	-1,0170	1,0170
			2		-1,00667	,44102	,052	-2,0236	,0103
			4		-,26667	,44102	,562	-1,2836	,7503
VSTi	LSD	1	2		-,06000	,88456	,948	-2,0998	1,9798
			4		-,24333	,88456	,790	-2,2831	1,7965
			8		-,46000	,88456	,617	-2,4998	1,5798
		2	1		,06000	,88456	,948	-1,9798	2,0998
			4		-,18333	,88456	,841	-2,2231	1,8565
			8		-,40000	,88456	,663	-2,4398	1,6398

		4	1	,24333	,88456	,790	-1,7965	2,2831
			2	,18333	,88456	,841	-1,8565	2,2231
			8	-,21667	,88456	,813	-2,2565	1,8231
		8	1	,46000	,88456	,617	-1,5798	2,4998
			2	,40000	,88456	,663	-1,6398	2,4398
			4	,21667	,88456	,813	-1,8231	2,2565
VSTe	LSD	1	2	-,27667	,75607	,724	-2,0202	1,4668
			4	-,46333	,75607	,557	-2,2068	1,2802
			8	-1,19000	,75607	,154	-2,9335	,5535
		2	1	,27667	,75607	,724	-1,4668	2,0202
			4	-,18667	,75607	,811	-1,9302	1,5568
			8	-,91333	,75607	,262	-2,6568	,8302
		4	1	,46333	,75607	,557	-1,2802	2,2068
			2	,18667	,75607	,811	-1,5568	1,9302
			8	-,72667	,75607	,365	-2,4702	1,0168
		8	1	1,19000	,75607	,154	-,5535	2,9335
			2	,91333	,75607	,262	-,8302	2,6568
			4	,72667	,75607	,365	-1,0168	2,4702
HSTi	LSD	1	2	,62667	,94732	,527	-1,5579	2,8112
			4	,72000	,94732	,469	-1,4645	2,9045
			8	,53667	,94732	,587	-1,6479	2,7212
		2	1	-,62667	,94732	,527	-2,8112	1,5579
			4	,09333	,94732	,924	-2,0912	2,2779
			8	-,09000	,94732	,927	-2,2745	2,0945
		4	1	-,72000	,94732	,469	-2,9045	1,4645
			2	-,09333	,94732	,924	-2,2779	2,0912
			8	-,18333	,94732	,851	-2,3679	2,0012
		8	1	-,53667	,94732	,587	-2,7212	1,6479
			2	,09000	,94732	,927	-2,0945	2,2745
			4	,18333	,94732	,851	-2,0012	2,3679
HSTe	LSD	1	2	,99667	1,56688	,542	-2,6166	4,6099
			4	1,49333	1,56688	,368	-2,1199	5,1066
			8	,32000	1,56688	,843	-3,2932	3,9332
		2	1	-,99667	1,56688	,542	-4,6099	2,6166
			4	,49667	1,56688	,759	-3,1166	4,1099
			8	-,67667	1,56688	,677	-4,2899	2,9366
		4	1	-1,49333	1,56688	,368	-5,1066	2,1199

			2		-,49667	1,56688	,759	-4,1099	3,1166
			8		-1,17333	1,56688	,475	-4,7866	2,4399
		8	1		-,32000	1,56688	,843	-3,9332	3,2932
			2		,67667	1,56688	,677	-2,9366	4,2899
			4		1,17333	1,56688	,475	-2,4399	4,7866
A_canal	LSD	1	2		3,84333	9,23864	,688	-	25,1477
			4		4,82667	9,23864	,616	17,4610	-
			8		3,21000	9,23864	,737	16,4777	-
								18,0943	-
		2	1		-3,84333	9,23864	,688	-	17,4610
			4		,98333	9,23864	,918	25,1477	-
			8		-,63333	9,23864	,947	20,3210	-
								21,9377	-
		4	1		-4,82667	9,23864	,616	-	16,4777
			2		-,98333	9,23864	,918	26,1310	-
			8		-1,61667	9,23864	,865	22,2877	-
								19,6877	-
		8	1		-3,21000	9,23864	,737	22,9210	-
			2		,63333	9,23864	,947	-	18,0943
			4		1,61667	9,23864	,865	24,5143	-
								20,6710	-
								19,6877	-
P_canal	LSD	1	2		,95000	2,93059	,754	-5,8080	7,7080
			4		,82667	2,93059	,785	-5,9313	7,5846
			8		,37333	2,93059	,902	-6,3846	7,1313
		2	1		-,95000	2,93059	,754	-7,7080	5,8080
			4		-,12333	2,93059	,967	-6,8813	6,6346
			8		-,57667	2,93059	,849	-7,3346	6,1813
		4	1		-,82667	2,93059	,785	-7,5846	5,9313
			2		,12333	2,93059	,967	-6,6346	6,8813
			8		-,45333	2,93059	,881	-7,2113	6,3046
		8	1		-,37333	2,93059	,902	-7,1313	6,3846
			2		,57667	2,93059	,849	-6,1813	7,3346
			4		,45333	2,93059	,881	-6,3046	7,2113
E_cor_d	LSD	1	2		-,353333	,181200	,087	-,77118	,06451
			4		-,186667	,181200	,333	-,60451	,23118
			8		-,050000	,181200	,790	-,46785	,36785
		2	1		,353333	,181200	,087	-,06451	,77118
			4		,166667	,181200	,385	-,25118	,58451
			8		,303333	,181200	,133	-,11451	,72118
		4	1		,186667	,181200	,333	-,23118	,60451

			2	-,166667	,181200	,385	-,58451	,25118
			8	,136667	,181200	,472	-,28118	,55451
		8	1	,050000	,181200	,790	-,36785	,46785
			2	-,303333	,181200	,133	-,72118	,11451
			4	-,136667	,181200	,472	-,55451	,28118
E_cor_i	LSD	1	2	-,36333	,52117	,505	-1,5652	,8385
			4	,21667	,52117	,689	-,9852	1,4185
			8	-,13333	,52117	,805	-1,3352	1,0685
		2	1	,36333	,52117	,505	-,8385	1,5652
			4	,58000	,52117	,298	-,6218	1,7818
			8	,23000	,52117	,671	-,9718	1,4318
		4	1	-,21667	,52117	,689	-1,4185	,9852
			2	-,58000	,52117	,298	-1,7818	,6218
			8	-,35000	,52117	,521	-1,5518	,8518
		8	1	,13333	,52117	,805	-1,0685	1,3352
			2	-,23000	,52117	,671	-1,4318	,9718
			4	,35000	,52117	,521	-,8518	1,5518

Kruskal-Wallis Test
Periodo 1-2 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material	EH_ad	EH_ai	EH_bd	EH_bi	VSTi	VSTe	HSTi	HSTe	A_canal	P_canal	E_cor_d	E_cor_i	
0	Chi-Square	,441	2,333	,000	1,000	,048	,429	,429	1,190	,048	,048	,429	,048
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,507	,127	1,000	,317	,827	,513	,513	,275	,827	,827	,513	,827
1	Chi-Square	,000	,429	,067	,054	1,190	3,857	,429	,429	,048	,048	,048	,429
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	1,000	,513	,796	,817	,275	,050	,513	,513	,827	,827	,827	,513
2	Chi-Square	,048	,429	1,000	1,000	,429	,048	,048	1,190	1,190	1,190	,441	3,971
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,513	,317	,317	,513	,827	,827	,275	,275	,275	,507	,046
3	Chi-Square	2,333	3,971	1,344	2,400	,048	,048	,429	,429	,048	,048	1,765	,429
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,127	,046	,246	,121	,827	,827	,513	,513	,827	,827	,184	,513

Periodo 2-4 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material		EH_ad	EH_ai	EH_bd	EH_bi	VSTi	VSTe	HSTi	HSTe	A_canal	P_canal	E_cor_d	E_cor_i
0	Chi-Square	1,225	3,971	,000	,067	,048	,048	,429	2,333	,429	1,190	,048	,441
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,268	,046	1,000	,796	,827	,827	,513	,127	,513	,275	,827	,507
1	Chi-Square	,784	,429	,067	,054	1,190	2,333	,429	,429	,048	,048	,429	,048
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,376	,513	,796	,817	,275	,127	,513	,513	,827	,827	,513	,827
2	Chi-Square	,429	,429	,067	1,000	,048	,048	1,190	,429	,429	,429	,048	3,971
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,513	,796	,317	,827	,827	,275	,513	,513	,513	,827	,046
3	Chi-Square	,048	,049	,054	1,344	,000	,048	,429	,429	,429	,429	1,190	2,333
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,825	,817	,246	1,000	,827	,513	,513	,513	,513	,275	,127

Periodo 4-8 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material		EH_ad	EH_ai	EH_bd	EH_bi	VSTi	VSTe	HSTi	HSTe	A_canal	P_canal	E_cor_d	E_cor_i
0	Chi-Square	1,333	3,158	1,500	,000	,000	,333	,333	,333	,333	,333	,333	,351
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,248	,076	,221	1,000	1,000	,564	,564	,564	,564	,564	,564	,554
1	Chi-Square	,784	,196	1,000	1,000	,048	,429	1,190	1,190	,429	,429	1,765	,429
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,376	,658	,317	,317	,827	,513	,275	,275	,513	,513	,184	,513
2	Chi-Square	,048	1,190	1,000	,000	,048	,429	1,190	,048	,429	,429	,048	1,344
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,275	,317	1,000	,827	,513	,275	,827	,513	,513	,827	,246
3	Chi-Square	,429	3,857	,067	1,000	,048	1,190	,048	1,190	,429	,429	,049	,784
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,050	,796	,317	,827	,275	,827	,275	,513	,513	,825	,376

Periodo 1-4 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material		EH_ad	EH_ai	EH_bd	EH_bi	VSTi	VSTe	HSTi	HSTe	A_canal	P_canal	E_cor_d	E_cor_i
0	Chi-Square	,000	1,344	,000	1,000	,048	,048	,048	,429	,429	,048	,000	,054
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	1,000	,246	1,000	,317	,827	,827	,827	,513	,513	,827	1,000	,817
1	Chi-Square	,784	,048	,067	,067	,048	1,190	1,190	1,190	1,190	1,190	,784	1,190
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,376	,827	,796	,796	,827	,275	,275	,275	,275	,275	,376	,275
2	Chi-Square	,048	,048	1,000	,000	,048	1,190	2,333	,429	,429	,429	,441	,067
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,827	,317	1,000	,827	,275	,127	,513	,513	,513	,507	,796
3	Chi-Square	,429	1,190	,067	1,000	,048	,048	,429	2,333	,429	,429	,048	,196
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,275	,796	,317	,827	,827	,513	,127	,513	,513	,827	,658

Periodo 1-8 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material		EH_ad	EH_ai	EH_bd	EH_bi	VSTi	VSTe	HSTi	HSTe	A_canal	P_canal	E_cor_d	E_cor_i
0	Chi-Square	,333	1,333	1,500	1,500	,333	,333	,333	,333	,333	,333	1,333	,333
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,564	,248	,221	,221	,564	,564	,564	,564	,564	,564	,248	,564
1	Chi-Square	,196	,048	1,000	1,000	,048	2,333	,048	,429	,048	,048	,196	,048
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,658	,827	,317	,317	,827	,127	,827	,513	,827	,827	,658	,827
2	Chi-Square	,429	1,765	,000	,000	,048	,429	,048	,048	,048	,048	,054	1,344
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,184	1,000	1,000	,827	,513	,827	,827	,827	,827	,817	,246
3	Chi-Square	,048	3,857	,067	,000	,048	1,190	,048	,048	,048	,048	,441	,196
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Asymp. Sig.	,827	,050	,796	1,000	,827	,275	,827	,827	,827	,827	,507	,658
-------------	------	------	------	-------	------	------	------	------	------	------	------	------

Periodo 2-8 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material		EH_ad	EH_ai	EH_bd	EH_bi	VSTi	VSTe	HSTi	HSTe	A_canal	P_canal	E_cor_d	E_cor_i
0	Chi-Square	,351	1,333	1,500	,000	,333	,000	3,000	,000	3,000	3,000	,000	,000
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,554	,248	,221	1,000	,564	1,000	,083	1,000	,083	,083	1,000	1,000
1	Chi-Square	,784	1,190	1,000	2,400	,429	,429	,048	,429	,429	,048	,048	,429
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,376	,275	,317	,121	,513	,513	,827	,513	,513	,827	,827	,513
2	Chi-Square	,048	1,190	1,000	1,000	,429	,196	,048	,429	1,190	,429	,429	,429
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,275	,317	,317	,513	,658	,827	,513	,275	,513	,513	,513
3	Chi-Square	,429	,441	1,344	2,400	1,190	2,333	,429	,429	,429	,429	3,971	,048
	df	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,507	,246	,121	,275	,127	,513	,513	,513	,513	,046	,827

Histomorfometría detallada, estudio por materiales

Materiales: 0 = Control, 1 = 7M3T, 2 = 5V5G, 3 = 5M5G

Test of Homogeneity of Variances

Periodo	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0	4,052	9	110	,000
1	6,722	9	110	,000
7	6,943	9	110	,000
14	5,649	9	110	,000

ANOVA

Periodo	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
0	Between Groups Within Groups Total	9 110 119	,088 ,015 ,103	,010 ,000	71,621 ,000
1	Between Groups Within Groups Total	9 110 119	,210 ,013 ,224	,023 ,000	194,076 ,000
7	Between Groups	9	1,202	,134	234,055 ,000

	Within Groups	,063	110	,001		
	Total	1,265	119			
14	Between Groups	,446	9	,050	102,876	,000
	Within Groups	,053	110	,000		
	Total	,499	119			

Multiple Comparisons

Periodo	Dependent Variable	(I) Material	(J) Material	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
							Lower Bound	Upper Bound	
1	A_roscas Tukey HSD	0	1	-,026667	,083566	,988	-,29428	,24094	
			2	-,083333	,083566	,755	-,35094	,18428	
			3	,030000	,083566	,983	-,23761	,29761	
		1	0	,026667	,083566	,988	-,24094	,29428	
			2	-,056667	,083566	,903	-,32428	,21094	
			3	,056667	,083566	,903	-,21094	,32428	
		2	0	,083333	,083566	,755	-,18428	,35094	
			1	,056667	,083566	,903	-,21094	,32428	
			3	,113333	,083566	,557	-,15428	,38094	
		3	0	-,030000	,083566	,983	-,29761	,23761	
			1	-,056667	,083566	,903	-,32428	,21094	
			2	-,113333	,083566	,557	-,38094	,15428	
	Bonferroni	0	1	0	-,026667	,083566	1,000	-,31738	,26405
				2	-,083333	,083566	1,000	-,37405	,20738
				3	,030000	,083566	1,000	-,26072	,32072
			1	0	,026667	,083566	1,000	-,26405	,31738
				2	-,056667	,083566	1,000	-,34738	,23405
				3	,056667	,083566	1,000	-,23405	,34738
			2	0	,083333	,083566	1,000	-,20738	,37405
				1	,056667	,083566	1,000	-,23405	,34738
				3	,113333	,083566	1,000	-,17738	,40405
			3	0	-,030000	,083566	1,000	-,32072	,26072
				1	-,056667	,083566	1,000	-,34738	,23405
				2	-,113333	,083566	1,000	-,40405	,17738
A_roi	Tukey HSD	0	1	-,046667	,060828	,867	-,24146	,14812	
			2	-,073333	,060828	,641	-,26812	,12146	

			3		-,020000	,060828	,987	-,21479	,17479
		1	0		,046667	,060828	,867	-,14812	,24146
			2		-,026667	,060828	,970	-,22146	,16812
			3		,026667	,060828	,970	-,16812	,22146
		2	0		,073333	,060828	,641	-,12146	,26812
			1		,026667	,060828	,970	-,16812	,22146
			3		,053333	,060828	,817	-,14146	,24812
		3	0		,020000	,060828	,987	-,17479	,21479
			1		-,026667	,060828	,970	-,22146	,16812
			2		-,053333	,060828	,817	-,24812	,14146
	Bonferroni	0	1		-,046667	,060828	1,000	-,25828	,16495
			2		-,073333	,060828	1,000	-,28495	,13828
			3		-,020000	,060828	1,000	-,23161	,19161
		1	0		,046667	,060828	1,000	-,16495	,25828
			2		-,026667	,060828	1,000	-,23828	,18495
			3		,026667	,060828	1,000	-,18495	,23828
		2	0		,073333	,060828	1,000	-,13828	,28495
			1		,026667	,060828	1,000	-,18495	,23828
			3		,053333	,060828	1,000	-,15828	,26495
		3	0		,020000	,060828	1,000	-,19161	,23161
			1		-,026667	,060828	1,000	-,23828	,18495
			2		-,053333	,060828	1,000	-,26495	,15828
	BIC	Tukey	0	1	,016667	,043589	,980	-,12292	,15625
		HSD		2	,053333	,043589	,630	-,08625	,19292
				3	,063333	,043589	,505	-,07625	,20292
		1	0		-,016667	,043589	,980	-,15625	,12292
			2		,036667	,043589	,834	-,10292	,17625
			3		,046667	,043589	,716	-,09292	,18625
		2	0		-,053333	,043589	,630	-,19292	,08625
			1		-,036667	,043589	,834	-,17625	,10292
			3		,010000	,043589	,995	-,12959	,14959
		3	0		-,063333	,043589	,505	-,20292	,07625
			1		-,046667	,043589	,716	-,18625	,09292
			2		-,010000	,043589	,995	-,14959	,12959
	Bonferroni	0	1		,016667	,043589	1,000	-,13497	,16831
			2		,053333	,043589	1,000	-,09831	,20497
			3		,063333	,043589	1,000	-,08831	,21497
		1	0		-,016667	,043589	1,000	-,16831	,13497

			2		,036667	,043589	1,000	-,11497	,18831
			3		,046667	,043589	1,000	-,10497	,19831
		2	0		-,053333	,043589	1,000	-,20497	,09831
			1		-,036667	,043589	1,000	-,18831	,11497
			3		,010000	,043589	1,000	-,14164	,16164
		3	0		-,063333	,043589	1,000	-,21497	,08831
			1		-,046667	,043589	1,000	-,19831	,10497
			2		-,010000	,043589	1,000	-,16164	,14164
2	A_roscas	Tukey HSD	0	1	-,183333	,060828	,065	-,37812	,01146
				2	-,013333	,060828	,996	-,20812	,18146
				3	-,073333	,060828	,641	-,26812	,12146
			1	0	,183333	,060828	,065	-,01146	,37812
				2	,170000	,060828	,089	-,02479	,36479
				3	,110000	,060828	,336	-,08479	,30479
			2	0	,013333	,060828	,996	-,18146	,20812
				1	-,170000	,060828	,089	-,36479	,02479
				3	-,060000	,060828	,761	-,25479	,13479
			3	0	,073333	,060828	,641	-,12146	,26812
				1	-,110000	,060828	,336	-,30479	,08479
				2	,060000	,060828	,761	-,13479	,25479
		Bonferroni	0	1	-,183333	,060828	,100	-,39495	,02828
				2	-,013333	,060828	1,000	-,22495	,19828
				3	-,073333	,060828	1,000	-,28495	,13828
			1	0	,183333	,060828	,100	-,02828	,39495
				2	,170000	,060828	,140	-,04161	,38161
				3	,110000	,060828	,649	-,10161	,32161
			2	0	,013333	,060828	1,000	-,19828	,22495
				1	-,170000	,060828	,140	-,38161	,04161
				3	-,060000	,060828	1,000	-,27161	,15161
			3	0	,073333	,060828	1,000	-,13828	,28495
				1	-,110000	,060828	,649	-,32161	,10161
				2	,060000	,060828	1,000	-,15161	,27161
	A_roi	Tukey HSD	0	1	-,143333	,056765	,130	-,32511	,03845
				2	-,030000	,056765	,950	-,21178	,15178
				3	-,083333	,056765	,497	-,26511	,09845
			1	0	,143333	,056765	,130	-,03845	,32511
				2	,113333	,056765	,265	-,06845	,29511
				3	,060000	,056765	,723	-,12178	,24178

		2	0	,030000	,056765	,950	-,15178	,21178
			1	-,113333	,056765	,265	-,29511	,06845
			3	-,053333	,056765	,785	-,23511	,12845
		3	0	,083333	,056765	,497	-,09845	,26511
			1	-,060000	,056765	,723	-,24178	,12178
			2	,053333	,056765	,785	-,12845	,23511
	Bonferroni	0	1	-,143333	,056765	,213	-,34081	,05414
			2	-,030000	,056765	1,000	-,22748	,16748
			3	-,083333	,056765	1,000	-,28081	,11414
		1	0	,143333	,056765	,213	-,05414	,34081
			2	,113333	,056765	,486	-,08414	,31081
			3	,060000	,056765	1,000	-,13748	,25748
		2	0	,030000	,056765	1,000	-,16748	,22748
			1	-,113333	,056765	,486	-,31081	,08414
			3	-,053333	,056765	1,000	-,25081	,14414
		3	0	,083333	,056765	1,000	-,11414	,28081
			1	-,060000	,056765	1,000	-,25748	,13748
			2	,053333	,056765	1,000	-,14414	,25081
	BIC	Tukey	0	,063333	,026458	,156	-,02139	,14806
		HSD		,063333	,026458	,156	-,02139	,14806
			3	,106667	,026458	,016	,02194	,19139
		1	0	-,063333	,026458	,156	-,14806	,02139
			2	,000000	,026458	1,000	-,08473	,08473
			3	,043333	,026458	,412	-,04139	,12806
		2	0	-,063333	,026458	,156	-,14806	,02139
			1	,000000	,026458	1,000	-,08473	,08473
			3	,043333	,026458	,412	-,04139	,12806
		3	0	-,106667	,026458	,016	-,19139	-,02194
			1	-,043333	,026458	,412	-,12806	,04139
			2	-,043333	,026458	,412	-,12806	,04139
	Bonferroni	0	1	,063333	,026458	,262	-,02871	,15538
			2	,063333	,026458	,262	-,02871	,15538
			3	,106667	,026458	,023	,01462	,19871
		1	0	-,063333	,026458	,262	-,15538	,02871
			2	,000000	,026458	1,000	-,09204	,09204
			3	,043333	,026458	,841	-,04871	,13538
		2	0	-,063333	,026458	,262	-,15538	,02871
			1	,000000	,026458	1,000	-,09204	,09204

			3		,043333	,026458	,841	-,04871	,13538
			3	0	-,106667	,026458	,023	-,19871	-,01462
				1	-,043333	,026458	,841	-,13538	,04871
				2	-,043333	,026458	,841	-,13538	,04871
4	A_roscas	Tukey	0	1	-,238333	,147754	,430	-,72742	,25076
		HSD		2	,055000	,147754	,981	-,43409	,54409
				3	-,051667	,147754	,984	-,54076	,43742
			1	0	,238333	,147754	,430	-,25076	,72742
				2	,293333	,132156	,207	-,14412	,73079
				3	,186667	,132156	,530	-,25079	,62412
			2	0	-,055000	,147754	,981	-,54409	,43409
				1	-,293333	,132156	,207	-,73079	,14412
				3	-,106667	,132156	,849	-,54412	,33079
			3	0	,051667	,147754	,984	-,43742	,54076
				1	-,186667	,132156	,530	-,62412	,25079
				2	,106667	,132156	,849	-,33079	,54412
		Bonferroni	0	1	-,238333	,147754	,905	-,77554	,29887
				2	,055000	,147754	1,000	-,48221	,59221
				3	-,051667	,147754	1,000	-,58887	,48554
			1	0	,238333	,147754	,905	-,29887	,77554
				2	,293333	,132156	,371	-,18716	,77383
				3	,186667	,132156	1,000	-,29383	,66716
			2	0	-,055000	,147754	1,000	-,59221	,48221
				1	-,293333	,132156	,371	-,77383	,18716
				3	-,106667	,132156	1,000	-,58716	,37383
			3	0	,051667	,147754	1,000	-,48554	,58887
				1	-,186667	,132156	1,000	-,66716	,29383
				2	,106667	,132156	1,000	-,37383	,58716
	A_roi	Tukey	0	1	-,215000	,129980	,411	-,64526	,21526
		HSD		2	,058333	,129980	,968	-,37192	,48859
				3	-,055000	,129980	,973	-,48526	,37526
			1	0	,215000	,129980	,411	-,21526	,64526
				2	,273333	,116258	,175	-,11150	,65817
				3	,160000	,116258	,550	-,22483	,54483
			2	0	-,058333	,129980	,968	-,48859	,37192
				1	-,273333	,116258	,175	-,65817	,11150
				3	-,113333	,116258	,768	-,49817	,27150
			3	0	,055000	,129980	,973	-,37526	,48526

		1		-,160000	,116258	,550	-,54483	,22483
		2		,113333	,116258	,768	-,27150	,49817
Bonferroni	0	1		-,215000	,129980	,853	-,68758	,25758
		2		,058333	,129980	1,000	-,41425	,53092
		3		-,055000	,129980	1,000	-,52758	,41758
		1	0	,215000	,129980	,853	-,25758	,68758
		2		,273333	,116258	,306	-,14936	,69602
		3		,160000	,116258	1,000	-,26269	,58269
		2	0	-,058333	,129980	1,000	-,53092	,41425
		1		-,273333	,116258	,306	-,69602	,14936
		3		-,113333	,116258	1,000	-,53602	,30936
		3	0	,055000	,129980	1,000	-,41758	,52758
		1		-,160000	,116258	1,000	-,58269	,26269
		2		,113333	,116258	1,000	-,30936	,53602
BIC	Tukey	0	1	-,075000	,094355	,855	-,38733	,23733
	HSD		2	,121667	,094355	,597	-,19066	,43400
			3	,051667	,094355	,944	-,26066	,36400
		1	0	,075000	,094355	,855	-,23733	,38733
		2		,196667	,084393	,180	-,08269	,47602
		3		,126667	,084393	,485	-,15269	,40602
		2	0	-,121667	,094355	,597	-,43400	,19066
		1		-,196667	,084393	,180	-,47602	,08269
		3		-,070000	,084393	,839	-,34936	,20936
		3	0	-,051667	,094355	,944	-,36400	,26066
		1		-,126667	,084393	,485	-,40602	,15269
		2		,070000	,084393	,839	-,20936	,34936
Bonferroni	0	1		-,075000	,094355	1,000	-,41805	,26805
		2		,121667	,094355	1,000	-,22139	,46472
		3		,051667	,094355	1,000	-,29139	,39472
		1	0	,075000	,094355	1,000	-,26805	,41805
		2		,196667	,084393	,316	-,11017	,50350
		3		,126667	,084393	1,000	-,18017	,43350
		2	0	-,121667	,094355	1,000	-,46472	,22139
		1		-,196667	,084393	,316	-,50350	,11017
		3		-,070000	,084393	1,000	-,37684	,23684
		3	0	-,051667	,094355	1,000	-,39472	,29139
		1		-,126667	,084393	1,000	-,43350	,18017
		2		,070000	,084393	1,000	-,23684	,37684

8	A_roscas	Tukey HSD	0	1	-,216667	,190863	,682	-,84845	,41512
				2	-,263333	,190863	,548	-,89512	,36845
				3	-,083333	,190863	,970	-,71512	,54845
			1	0	,216667	,190863	,682	-,41512	,84845
				2	-,046667	,170713	,992	-,61175	,51842
				3	,133333	,170713	,861	-,43175	,69842
			2	0	,263333	,190863	,548	-,36845	,89512
				1	,046667	,170713	,992	-,51842	,61175
				3	,180000	,170713	,726	-,38509	,74509
	3	0	,083333	,190863	,970	-,54845	,71512		
		1	-,133333	,170713	,861	-,69842	,43175		
		2	-,180000	,170713	,726	-,74509	,38509		
	Bonferroni	0	1	1	-,216667	,190863	1,000	-,91061	,47727
				2	-,263333	,190863	1,000	-,95727	,43061
				3	-,083333	,190863	1,000	-,77727	,61061
			1	0	,216667	,190863	1,000	-,47727	,91061
				2	-,046667	,170713	1,000	-,66735	,57401
				3	,133333	,170713	1,000	-,48735	,75401
			2	0	,263333	,190863	1,000	-,43061	,95727
				1	,046667	,170713	1,000	-,57401	,66735
				3	,180000	,170713	1,000	-,44068	,80068
	3	0	,083333	,190863	1,000	-,61061	,77727		
		1	-,133333	,170713	1,000	-,75401	,48735		
		2	-,180000	,170713	1,000	-,80068	,44068		
	A_roi	Tukey HSD	0	1	-,191667	,166756	,674	-,74366	,36032
				2	-,235000	,166756	,532	-,78699	,31699
				3	-,051667	,166756	,989	-,60366	,50032
1			0	,191667	,166756	,674	-,36032	,74366	
			2	-,043333	,149151	,991	-,53705	,45038	
			3	,140000	,149151	,786	-,35371	,63371	
2			0	,235000	,166756	,532	-,31699	,78699	
			1	,043333	,149151	,991	-,45038	,53705	
			3	,183333	,149151	,630	-,31038	,67705	
3	0	,051667	,166756	,989	-,50032	,60366			
	1	-,140000	,149151	,786	-,63371	,35371			
	2	-,183333	,149151	,630	-,67705	,31038			
Bonferroni	0	1	1	-,191667	,166756	1,000	-,79796	,41463	

			2	-,235000	,166756	1,000	-,84129	,37129
			3	-,051667	,166756	1,000	-,65796	,55463
		1	0	,191667	,166756	1,000	-,41463	,79796
			2	-,043333	,149151	1,000	-,58562	,49895
			3	,140000	,149151	1,000	-,40228	,68228
		2	0	,235000	,166756	1,000	-,37129	,84129
			1	,043333	,149151	1,000	-,49895	,58562
			3	,183333	,149151	1,000	-,35895	,72562
		3	0	,051667	,166756	1,000	-,55463	,65796
			1	-,140000	,149151	1,000	-,68228	,40228
			2	-,183333	,149151	1,000	-,72562	,35895
BIC	Tukey HSD	0	1	-,025000	,049901	,956	-,19018	,14018
			2	,078333	,049901	,451	-,08685	,24351
			3	,085000	,049901	,389	-,08018	,25018
		1	0	,025000	,049901	,956	-,14018	,19018
			2	,103333	,044633	,183	-,04441	,25107
			3	,110000	,044633	,151	-,03774	,25774
		2	0	-,078333	,049901	,451	-,24351	,08685
			1	-,103333	,044633	,183	-,25107	,04441
			3	,006667	,044633	,999	-,14107	,15441
		3	0	-,085000	,049901	,389	-,25018	,08018
			1	-,110000	,044633	,151	-,25774	,03774
			2	-,006667	,044633	,999	-,15441	,14107
	Bonferroni	0	1	-,025000	,049901	1,000	-,20643	,15643
			2	,078333	,049901	,963	-,10310	,25976
			3	,085000	,049901	,794	-,09643	,26643
		1	0	,025000	,049901	1,000	-,15643	,20643
			2	,103333	,044633	,323	-,05894	,26561
			3	,110000	,044633	,259	-,05228	,27228
		2	0	-,078333	,049901	,963	-,25976	,10310
			1	-,103333	,044633	,323	-,26561	,05894
			3	,006667	,044633	1,000	-,15561	,16894
		3	0	-,085000	,049901	,794	-,26643	,09643
			1	-,110000	,044633	,259	-,27228	,05228
			2	-,006667	,044633	1,000	-,16894	,15561

Kruskal-Wallis Test

Material Control-7M3T

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_rosclas	A_roi	BIC
1	Chi-Square	,429	1,190	,048
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,275	,827
2	Chi-Square	3,857	3,857	3,857
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,050	,050	,050
4	Chi-Square	1,333	1,333	,000
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,248	,248	1,000
8	Chi-Square	3,158	3,000	,333
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,076	,083	,564

Material 7M3T-5V5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_rosclas	A_roi	BIC
1	Chi-Square	,429	,429	,429
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,513	,513
2	Chi-Square	3,857	3,857	,000
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,050	,050	1,000
4	Chi-Square	2,333	2,333	3,857
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,127	,127	,050
8	Chi-Square	,048	,048	3,857
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,827	,050

Material 5V5G-5M5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_rosclas	A_roi	BIC
1	Chi-Square	3,971	1,765	,196
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,046	,184	,658
2	Chi-Square	,429	,429	1,344
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,513	,246
4	Chi-Square	2,333	2,333	2,402
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,127	,127	,121
8	Chi-Square	,049	,429	,048
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,825	,513	,827

Material Control-5V5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_rosclas	A_roi	BIC
1	Chi-Square	,429	,429	,784
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,513	,376
2	Chi-Square	,048	1,190	3,137
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,275	,077
4	Chi-Square	1,333	,333	3,000
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,248	,564	,083
8	Chi-Square	3,158	3,000	3,000
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,076	,083	,083

Material Control-5M5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_rosca	A_roi	BIC
1	Chi-Square	,049	,429	1,263
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,825	,513	,261
2	Chi-Square	1,190	1,190	3,971
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,275	,275	,046
4	Chi-Square	,333	,333	3,158
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,564	,564	,076
8	Chi-Square	3,333	,333	3,000
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,068	,564	,083

Material 7M3T-5M5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_rosca	A_roi	BIC
1	Chi-Square	,049	,048	1,190
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,825	,827	,275
2	Chi-Square	1,190	,429	1,344
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,275	,513	,246
4	Chi-Square	1,190	1,190	1,225
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,275	,275	,268
8	Chi-Square	,441	1,190	3,857
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,507	,275	,050

Histomorfometría detallada, estudio por periodos

Materiales: 0 = Control, 1 = 7M3T, 2 = 5V5G, 3 = 5M5G

Test of Homogeneity of Variances

Material		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0	A_rosca	4,849	3	6	,048
	A_roi	3,942	3	6	,072
	BIC	5,710	3	6	,034
1	A_rosca	2,677	3	8	,118
	A_roi	2,688	3	8	,117
	BIC	4,493	3	8	,040
2	A_rosca	10,634	3	8	,004
	A_roi	8,395	3	8	,007
	BIC	,683	3	8	,587
3	A_rosca	2,092	3	8	,180
	A_roi	1,089	3	8	,408
	BIC	3,399	3	8	,074

ANOVA

Material			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
0	A_rosclas	Between Groups	,005	3	,002	,168	,914
		Within Groups	,064	6	,011		
		Total	,069	9			
	A_roi	Between Groups	,002	3	,001	,115	,948
		Within Groups	,042	6	,007		
		Total	,044	9			
	BIC	Between Groups	,004	3	,001	,760	,556
		Within Groups	,012	6	,002		
		Total	,016	9			
1	A_rosclas	Between Groups	,050	3	,017	,476	,708
		Within Groups	,280	8	,035		
		Total	,330	11			
	A_roi	Between Groups	,056	3	,019	,764	,545
		Within Groups	,197	8	,025		
		Total	,253	11			
	BIC	Between Groups	,034	3	,011	,934	,468
		Within Groups	,096	8	,012		
		Total	,129	11			
2	A_rosclas	Between Groups	,165	3	,055	1,932	,203
		Within Groups	,228	8	,028		
		Total	,392	11			
	A_roi	Between Groups	,129	3	,043	2,097	,179
		Within Groups	,164	8	,020		
		Total	,292	11			
	BIC	Between Groups	,008	3	,003	1,616	,261
		Within Groups	,013	8	,002		
		Total	,022	11			
3	A_rosclas	Between Groups	,006	3	,002	,368	,778
		Within Groups	,046	8	,006		
		Total	,052	11			

A_roi	Between Groups	,003	3	,001	,166	,917
	Within Groups	,056	8	,007		
	Total	,060	11			
BIC	Between Groups	,005	3	,002	2,044	,186
	Within Groups	,006	8	,001		
	Total	,011	11			

Kruskal-Wallis Test

Periodo 1-2 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material		A_roscas	A_roi	BIC
0	Chi-Square	,048	,048	,429
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,827	,513
1	Chi-Square	,784	1,190	,048
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,376	,275	,827
2	Chi-Square	3,857	3,857	1,190
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,050	,050	,275
3	Chi-Square	,441	,429	,202
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,507	,513	,653

Periodo 2-4 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material		A_roscas	A_roi	BIC
0	Chi-Square	,333	,333	,789
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,564	,564	,374
1	Chi-Square	,048	,429	1,190
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,513	,275
2	Chi-Square	1,190	,455	2,333
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,275	,500	,127
3	Chi-Square	,048	,048	3,333
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,827	,068

Periodo 4-8 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material		A_roscas	A_roi	BIC
0	Chi-Square	,000	,000	,167
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	1,000	1,000	,683
1	Chi-Square	,048	,196	,196
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,658	,658

Periodo 1-4 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material		A_roscas	A_roi	BIC
0	Chi-Square	,000	,000	,333
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	1,000	1,000	,564
1	Chi-Square	,429	2,333	1,190
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,127	,275

2	Chi-Square	3,857	3,857	,784
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,050	,050	,376
3	Chi-Square	,049	,048	1,818
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,825	,827	,178

2	Chi-Square	3,857	3,857	,784
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,050	,050	,376
3	Chi-Square	1,225	,784	1,818
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,268	,376	,178

Periodo 1-8 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material		A_rosclas	A_roi	BIC
0	Chi-Square	,351	,333	,333
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,554	,564	,564
1	Chi-Square	1,190	1,190	1,190
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,275	,275	,275
2	Chi-Square	,429	,196	,048
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,658	,827
3	Chi-Square	2,722	,429	,051
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,099	,513	,822

Periodo 2-8 semanas

Test Statistics^{a,b}

Material		A_rosclas	A_roi	BIC
0	Chi-Square	,351	,088	2,193
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,554	,767	,139
1	Chi-Square	,000	,048	,429
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	1,000	,827	,513
2	Chi-Square	3,857	3,857	1,765
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,050	,050	,184
3	Chi-Square	,054	,048	,202
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,817	,827	,653

Histomorfometría detallada, estudio por materiales

Materiales: 0 = Control, 1 = 7M3T, 2 = 5V5G, 3 = 5M5G

Test of Homogeneity of Variances

Proliferación				
Periodo	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0	4,052	9	110	,000
1	6,722	9	110	,000
7	6,943	9	110	,000

ANOVA

Proliferación						
Periodo		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
0	Between Groups	,088	9	,010	71,621	,000
	Within Groups	,015	110	,000		
	Total	,103	119			

14	5,649	9	110	,000
----	-------	---	-----	------

1	Between Groups	,210	9	,023	194,076	,000
	Within Groups	,013	110	,000		
	Total	,224	119			
7	Between Groups	1,202	9	,134	234,055	,000
	Within Groups	,063	110	,001		
	Total	1,265	119			
14	Between Groups	,446	9	,050	102,876	,000
	Within Groups	,053	110	,000		
	Total	,499	119			

Kruskal-Wallis Test

Material Control-7M3T

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_ roscas	A_ roi	BIC
1	Chi-Square	,429	1,190	,048
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,275	,827
2	Chi-Square	3,857	3,857	3,857
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,050	,050	,050
4	Chi-Square	1,333	1,333	,000
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,248	,248	1,000
8	Chi-Square	3,158	3,000	,333
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,076	,083	,564

Material 7M3T-5V5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_ roscas	A_ roi	BIC
1	Chi-Square	,429	,429	,429
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,513	,513
2	Chi-Square	3,857	3,857	,000
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,050	,050	1,000
4	Chi-Square	2,333	2,333	3,857
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,127	,127	,050
8	Chi-Square	,048	,048	3,857
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,827	,827	,050

Material 5V5G-5M5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_ roscas	A_ roi	BIC
1	Chi-Square	3,971	1,765	,196
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,046	,184	,658
2	Chi-Square	,429	,429	1,344
	df	1	1	1

Material Control-5V5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_ roscas	A_ roi	BIC
1	Chi-Square	,429	,429	,784
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,513	,513	,376
2	Chi-Square	,048	1,190	3,137
	df	1	1	1

	Asymp. Sig.	,513	,513	,246
4	Chi-Square	2,333	2,333	2,402
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,127	,127	,121
8	Chi-Square	,049	,429	,048
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,825	,513	,827

	Asymp. Sig.	,827	,275	,077
4	Chi-Square	1,333	,333	3,000
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,248	,564	,083
8	Chi-Square	3,158	3,000	3,000
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,076	,083	,083

Material Control-5M5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_ roscas	A_ roi	BIC
1	Chi-Square	,049	,429	1,263
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,825	,513	,261
2	Chi-Square	1,190	1,190	3,971
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,275	,275	,046
4	Chi-Square	,333	,333	3,158
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,564	,564	,076
8	Chi-Square	3,333	,333	3,000
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,068	,564	,083

Material 7M3T-5M5G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		A_ roscas	A_ roi	BIC
1	Chi-Square	,049	,048	1,190
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,825	,827	,275
2	Chi-Square	1,190	,429	1,344
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,275	,513	,246
4	Chi-Square	1,190	1,190	1,225
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,275	,275	,268
8	Chi-Square	,441	1,190	3,857
	df	1	1	1
	Asymp. Sig.	,507	,275	,050

ANEXO 2

Tablas del estudio estadístico de los resultados de la Fase de Caracterización II

Ángulo de contacto

Test of Homogeneity of Variances

Angulo_cto			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,068	3	32	,124

ANOVA

Angulo_cto					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3810,028	3	1270,009	96,199	,000
Within Groups	422,462	32	13,202		
Total	4232,490	35			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Angulo_cto

	(I) Materia	(J) Materia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	4	5	17,01667 [*]	1,71282	,000	12,3760	21,6573
		6	19,76667 [*]	1,71282	,000	15,1260	24,4073
		7	23,80000 [*]	1,71282	,000	19,1593	28,4407
	5	4	-17,01667 [*]	1,71282	,000	-21,6573	-12,3760
		6	2,75000	2,09777	,563	-2,9336	8,4336
		7	6,78333 [†]	2,09777	,014	1,0997	12,4670
	6	4	-19,76667 [*]	1,71282	,000	-24,4073	-15,1260
		5	-2,75000	2,09777	,563	-8,4336	2,9336
		7	4,03333	2,09777	,239	-1,6503	9,7170
	7	4	-23,80000 [*]	1,71282	,000	-28,4407	-19,1593
		5	-6,78333 [†]	2,09777	,014	-12,4670	-1,0997
		6	-4,03333	2,09777	,239	-9,7170	1,6503
LSD	4	5	17,01667 [*]	1,71282	,000	13,5278	20,5056
		6	19,76667 [*]	1,71282	,000	16,2778	23,2556
		7	23,80000 [*]	1,71282	,000	20,3111	27,2889
	5	4	-17,01667 [*]	1,71282	,000	-20,5056	-13,5278
		6	2,75000	2,09777	,199	-1,5230	7,0230

	7	6,78333	2,09777	,003	2,5103	11,0564
6	4	19,76667	1,71282	,000	-23,2556	16,2778
	5	-2,75000	2,09777	,199	-7,0230	1,5230
	7	4,03333	2,09777	,063	-,2397	8,3064
7	4	23,80000	1,71282	,000	-27,2889	20,3111
	5	-6,78333	2,09777	,003	-11,0564	-2,5103
	6	-4,03333	2,09777	,063	-8,3064	,2397

Degradación *in vitro*

Materiales; 5=7M3T, 6=7M3T+G, 7=3X

Test of Homogeneity of Variances

ANOVA

Degradación

Periodo	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1	8,000	2	6	,020
7	,000	2	6	1,000
14	,857	2	6	,471

Degradación

Periodo		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Between Groups	,000	2	,000	,500	,630
	Within Groups	,000	6	,000		
	Total	,000	8			
7	Between Groups	,000	2	,000	2,333	,178
	Within Groups	,000	6	,000		
	Total	,000	8			
14	Between Groups	,000	2	,000	,875	,464
	Within Groups	,001	6	,000		
	Total	,001	8			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Degradación

Periodo	(I) Material	(J) Material	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
7	Tukey HSD	5	6	,00667	,00471	,392	-,0078	,0211
		7	,01000	,00471	,165	-,0045	,0245	
	6	5	7	-,00667	,00471	,392	-,0211	,0078
		7	,00333	,00471	,768	-,0111	,0178	
	7	5	6	-,01000	,00471	,165	-,0245	,0045
		6	7	-,00333	,00471	,768	-,0178	,0111

LSD	5	6	,00667	,00471	,207	-,0049	,0182
		7	,01000	,00471	,078	-,0015	,0215
	6	5	-,00667	,00471	,207	-,0182	,0049
		7	,00333	,00471	,506	-,0082	,0149
	7	5	-,01000	,00471	,078	-,0215	,0015
		6	-,00333	,00471	,506	-,0149	,0082

Kruskal-Wallis Test

Material 7M3T-7M3T+G

Test Statistics^{a,b}

Periodo		Degradación
1	Chi-Square df	,000 1
	Asymp. Sig.	1,000
7	Chi-Square df	1,667 1
	Asymp. Sig.	,197
14	Chi-Square df	,484 1
	Asymp. Sig.	,487

Material 7M3T+G-3X

Test Statistics^{a,b}

Periodo		Degradación
1	Chi-Square df	1,000 1
	Asymp. Sig.	,317
7	Chi-Square df	,556 1
	Asymp. Sig.	,456
14	Chi-Square df	1,667 1
	Asymp. Sig.	,197

Material 7M3T-3X

Test Statistics^{a,b}

Periodo		Degradación
1	Chi-Square df	1,000 1
	Asymp. Sig.	,317
7	Chi-Square df	2,722 1
	Asymp. Sig.	,099
14	Chi-Square df	,222 1
	Asymp. Sig.	,637

Bioactividad de las superficies, estudio por materiales

Materiales; 4 = Control, 5 = 7M3T, 6 = 7M3T+G, 7 = 3X

Periodo = 1

Test of Homogeneity of Variances^a

Bioactividad	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	3,009	3	8	,095

ANOVA^a

Bioactividad	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,010	3	,003	1,249	,355
Within Groups	,022	8	,003		
Total	,032	11			

Periodo = 7

Test of Homogeneity of Variances^a

Bioactividad

ANOVA^a

Bioactividad

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,197	3	8	,166

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,021	3	,007	1,325	,332
Within Groups	,042	8	,005		
Total	,063	11			

Periodo = 14

Test of Homogeneity of Variances^a

ANOVA^a

Bioactividad

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,949	3	8	,200

Bioactividad

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,085	3	,028	3,175	,085
Within Groups	,072	8	,009		
Total	,157	11			

Bioactividad de las superficies, estudio por periodos

Materiales; 4 = Control, 5 = 7M3T, 6 = 7M3T+G, 7 = 3X

Material = 4

Test of Homogeneity of Variances^a

ANOVA^a

Bioactividad

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,250	2	6	,187

Bioactividad

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,086	2	,043	14,946	,005
Within Groups	,017	6	,003		
Total	,103	8			

Multiple Comparisons^a

(I) Periodo	(J) Periodo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	7	,013333	,043716	1,000	-,13038	,15705
	14	-,200000 ⁺	,043716	,011	-,34372	-,05628
7	1	-,013333	,043716	1,000	-,15705	,13038
	14	-,213333 ⁺	,043716	,008	-,35705	-,06962
14	1	,200000 ⁺	,043716	,011	,05628	,34372
	7	,213333 ⁺	,043716	,008	,06962	,35705

Material = 5

Test of Homogeneity of Variances^a

Bioactividad			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,807	2	6	,489

ANOVA^a

Bioactividad					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,037	2	,019	1,400	,317
Within Groups	,080	6	,013		
Total	,117	8			

Material = 6

Test of Homogeneity of Variances^a

Bioactividad			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,347	2	6	,329

ANOVA^a

Bioactividad					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,028	2	,014	3,010	,124
Within Groups	,028	6	,005		
Total	,056	8			

Material = 7

Test of Homogeneity of Variances^a

Bioactividad			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,095	2	6	,393

ANOVA^a

Bioactividad					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,036	2	,018	9,538	,014
Within Groups	,011	6	,002		
Total	,047	8			

Multiple Comparisons^a

(I) Periodo	(J) Periodo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	7	-,140000	,035382	,022	-,25632	-,02368
	14	-,013333	,035382	1,000	-,12965	,10298
7	1	,140000	,035382	,022	,02368	,25632
	14	,126667	,035382	,035	,01035	,24298
14	1	-,013333	,035382	1,000	-,10298	,12965
	7	-,126667	,035382	,035	-,24298	-,01035

Adhesión celular

T-Test

Material Control-7M3T

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Adhesion	Equal variances assumed	,226	,659	10,165	4	,001	,02298	,00226	,01670	,02926
	Equal variances not assumed			10,165	3,745	,001	,02298	,00226	,01653	,02943

Material 7M3T-7M3T+G

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Adhesion	Equal variances assumed	7,310	,054	-10,697	4	,000	-,01497	,00140	-,01886	-,01109
	Equal variances not assumed			-10,697	2,150	,007	-,01497	,00140	-,02061	-,00934

Material 7M3T+G-3X

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Adhesion	Equal variances assumed	5,793	,074	45,457	4	,000	,01239	,00027	,01164	,01315

Equal variances not assumed			45,457	2,187	,000	,01239	,00027	,01131	,01347
-----------------------------	--	--	--------	-------	------	--------	--------	--------	--------

Material Control-7M3T+G

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Adhesion	Equal variances assumed	5,359	,082	4,412	4	,012	,00801	,00181	,00297	,01305
	Equal variances not assumed			4,412	2,088	,044	,00801	,00181	,00051	,01551

Material Control-3X

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Adhesion	Equal variances assumed	7,133	,056	11,359	4	,000	,02040	,00180	,01541	,02539
	Equal variances not assumed			11,359	2,004	,008	,02040	,00180	,01269	,02811

Material 7M3T-3X

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper

Adhesion	Equal variances assumed	10,769	,030	-1,875	4	,134	-,00258	,00138	-	,00124
	Equal variances not assumed			-1,875	2,007	,201	-,00258	,00138	-	,00332

Proliferación celular, estudio por periodos

Periodo = 1 día

Test of Homogeneity of Variances^a

ANOVA^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
28,515	3	32	,000

Valor obtenido para ensayo proliferación

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19,597	3	6,532	2,637	,066
Within Groups	79,268	32	2,477		
Total	98,865	35			

Periodo = 7 días

Test of Homogeneity of Variances^a

ANOVA^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
16,101	3	32	,000

Valor obtenido para ensayo proliferación

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	116,674	3	38,891	1,372	,269
Within Groups	907,418	32	28,357		
Total	1024,093	35			

Periodo = 14 días

Test of Homogeneity of Variances^a

ANOVA^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
14,096	3	32	,000

Valor obtenido para ensayo proliferación

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37313,190	3	12437,730	37,242	,000
Within Groups	10687,014	32	333,969		
Total	48000,203	35			

Multiple Comparisons^a

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
Recubrimiento	Recubrimiento				

					Lower Bound	Upper Bound
7M3T	7M3T+G	64,18252	8,61483	,000	39,9546	88,4104
	TRIPLE	-11,65288	8,61483	1,000	-35,8808	12,5750
	CONTROL	-15,36387	8,61483	,504	-39,5917	8,8640
7M3T+G	7M3T	-64,18252	8,61483	,000	-88,4104	-39,9546
	TRIPLE	-75,83540 ⁺	8,61483	,000	-100,0633	-51,6075
	CONTROL	-79,54639 ⁻	8,61483	,000	-103,7743	-55,3185
TRIPLE	7M3T	11,65288	8,61483	1,000	-12,5750	35,8808
	7M3T+G	75,83540 ⁻	8,61483	,000	51,6075	100,0633
	CONTROL	-3,71099	8,61483	1,000	-27,9389	20,5169
CONTROL	7M3T	15,36387	8,61483	,504	-8,8640	39,5917
	7M3T+G	79,54639 ⁺	8,61483	,000	55,3185	103,7743
	TRIPLE	3,71099	8,61483	1,000	-20,5169	27,9389

Kruskal-Wallis Test

Material 7M3T-7M3T+G

Periodo = 1 día

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	1,421
df	1
Asymp. Sig.	,233

Periodo = 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	1,421
df	1
Asymp. Sig.	,233

Periodo = 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 7M3T+G-3X

Periodo = 1 día

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	3,997
df	1
Asymp. Sig.	,046

Periodo = 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	,160
df	1
Asymp. Sig.	,689

Periodo = 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,950
df	1
Asymp. Sig.	,000

Material 3X-Control

Periodo = 1 día

Test Statistics^{a,b,c}

Periodo = 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

Periodo = 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	11,102
df	1
Asymp. Sig.	,001

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	,444
df	1
Asymp. Sig.	,505

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	,018
df	1
Asymp. Sig.	,894

Material 7M3T-3X

Periodo = 1 día

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	1,439
df	1
Asymp. Sig.	,230

Periodo = 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	1,439
df	1
Asymp. Sig.	,230

Periodo = 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	,870
df	1
Asymp. Sig.	,351

Material 7M3T-Control

Periodo = 1 día

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo = 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	4,680
df	1
Asymp. Sig.	,031

Material 7M3T+G-Control

Periodo = 1 día

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	1,421
df	1
Asymp. Sig.	,233

Periodo = 7 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	1,421
df	1
Asymp. Sig.	,233

Periodo = 14 días

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Proliferación celular, por materiales

Recubrimiento = 7M3T

Test of Homogeneity of Variances^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
44,198	2	24	,000

ANOVA^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31110,499	2	15555,250	166,258	,000
Within Groups	2245,468	24	93,561		
Total	33355,967	26			

Recubrimiento = 7M3T+G

Test of Homogeneity of Variances^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
23,881	2	24	,000

ANOVA^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	773,352	2	386,676	14,519	,000
Within Groups	639,163	24	26,632		
Total	1412,515	26			

Recubrimiento = TRIPLE

Test of Homogeneity of Variances^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
16,470	2	24	,000

ANOVA^a

Valor obtenido para ensayo proliferación

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	42276,425	2	21138,212	60,140	,000
Within Groups	8435,635	24	351,485		
Total	50712,059	26			

Kruskal-Wallis Test

Periodo 1-7 días

Recubrimiento = 7M3T

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Recubrimiento = 7M3T+G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	3,947
df	1
Asymp. Sig.	,047

Recubrimiento = TRIPLE

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	
df	
Asymp. Sig.	

Recubrimiento = CONTROL

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	
df	
Asymp. Sig.	

Chi-Square	7,933
df	1
Asymp. Sig.	,005

Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 7-14 días

Recubrimiento = 7M3T

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Recubrimiento = 7M3T+G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	,860
df	1
Asymp. Sig.	,354

Recubrimiento = TRIPLE

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	13,114
df	1
Asymp. Sig.	,000

Recubrimiento = CONTROL

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Periodo 1-14 días

Recubrimiento = 7M3T

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1
Asymp. Sig.	,000

Recubrimiento = 7M3T+G

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	,860
df	1
Asymp. Sig.	,354

Recubrimiento = TRIPLE

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	13,114
df	1

Recubrimiento = CONTROL

Test Statistics^{a,b,c}

	Valor obtenido para ensayo proliferación
Chi-Square	12,789
df	1

Asymp. Sig.	,000
-------------	------

Asymp. Sig.	,000
-------------	------

Diferenciación celular, estudio por periodos

Periodo = 7 días

Test of Homogeneity of Variances^a

Mineralización			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,784	3	8	,228

ANOVA^a

Mineralización					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21,112	3	7,037	43,267	,000
Within Groups	1,301	8	,163		
Total	22,413	11			

Multiple Comparisons^a

Dependent Variable: Mineralización

	(I) Nombre	(J) Nombre	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	Control	7M3T	-,16347	,32929	,633	-,9228	,5959
		7M3T+G	-3,20135 [*]	,32929	,000	-3,9607	-2,4420
		3X	-,27621	,32929	,426	-1,0356	,4831
	7M3T	Control	,16347	,32929	,633	-,5959	,9228
		7M3T+G	-3,03787 [*]	,32929	,000	-3,7972	-2,2785
		3X	-,11273	,32929	,741	-,8721	,6466
	7M3T+G	Control	3,20135	,32929	,000	2,4420	3,9607
		7M3T	3,03787 [*]	,32929	,000	2,2785	3,7972
		3X	2,92514 [*]	,32929	,000	2,1658	3,6845
3X	Control	,27621	,32929	,426	-,4831	1,0356	
	7M3T	,11273	,32929	,741	-,6466	,8721	
	7M3T+G	-2,92514 [*]	,32929	,000	-3,6845	-2,1658	

Periodo = 14 días

Test of Homogeneity of Variances^a

Mineralización			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,509	3	8	,059

ANOVA^a

Mineralización					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8,169	3	2,723	993,171	,000

Within Groups	,022	8	,003		
Total	8,191	11			

Multiple Comparisons^a

Dependent Variable: Mineralización

	(I) Nombre	(J) Nombre	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	Control	7M3T	-,16975	,04275	,004	-,2683	-,0712
		7M3T+G	-1,97223	,04275	,000	-2,0708	-
		3X	-,04689	,04275	,305	-,1455	1,8736
	7M3T	Control	,16975	,04275	,004	,0712	,2683
		7M3T+G	-1,80248	,04275	,000	-1,9011	-
		3X	,12287	,04275	,021	,0243	1,7039
	7M3T+G	Control	1,97223	,04275	,000	1,8736	2,0708
		7M3T	1,80248	,04275	,000	1,7039	1,9011
		3X	1,92534	,04275	,000	1,8268	2,0239
3X	Control	,04689	,04275	,305	-,0517	,1455	
	7M3T	-,12287	,04275	,021	-,2215	-,0243	
	7M3T+G	-1,92534	,04275	,000	-2,0239	-	
						1,8268	

Diferenciación celular, estudio por materiales

Nombre = Control

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper	
Mineralización	Equal variances assumed	6,907	,058	4,785	4	,009	1,47453	,30813	,61904	2,33002	
	Equal variances not assumed			4,785	2,015	,040	1,47453	,30813	,15812	2,79094	

Nombre = 7M3T

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	15,043	,018	5,009	4	,007	1,46825	,29314	,65437	2,28213
	Equal variances not assumed			5,009	2,004	,037	1,46825	,29314	,20920	2,72731

Nombre = 7M3T+G

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	2,875	,165	18,493	4	,000	2,70365	,14620	2,29773	3,10957
	Equal variances not assumed			18,493	2,633	,001	2,70365	,14620	2,19943	3,20788

Nombre = 3X

Independent Samples Test^a

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Mineralización	Equal variances assumed	10,012	,034	12,602	4	,000	1,70385	,13520	1,32847	2,07923
	Equal variances not assumed			12,602	2,053	,006	1,70385	,13520	1,13626	2,27144

Respuesta de reacción a cuerpo extraño

ANOVA

Test of Homogeneity of Variances

Media				
Periodo	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1 semana	,679	3	8	,589
2 semanas	4,143	3	8	,048

Media						
Periodo		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 semana	Between Groups	7,182	3	2,394	1,636	,257
	Within Groups	11,708	8	1,464		
	Total	18,891	11			
2 semanas	Between Groups	6,457	3	2,152	1,872	,213
	Within Groups	9,198	8	1,150		
	Total	15,656	11			

Kruskal-Wallis Test

Material 4-5

Test Statistics^{a,b}

Periodo	Media
2 semanas	1,765
Chi-Square	
df	1
Asymp. Sig.	,184

Material 5-6

Test Statistics^{a,b}

Periodo	Media
2 semanas	,000
Chi-Square	
df	1
Asymp. Sig.	1,000

Material 6-7

Test Statistics^{a,b}

Periodo	Media
2 semanas	1,190
Chi-Square	
df	1
Asymp. Sig.	,275

Material 4-6

Test Statistics^{a,b}

Periodo	Media
2 semanas	,429
Chi-Square	
df	1
Asymp. Sig.	,513

Material 4-7

Test Statistics^{a,b}

Periodo	Media
2 semanas	2,333
Chi-Square	
df	1

Material 5-7

Test Statistics^{a,b}

Periodo	Media
2 semanas	3,857
Chi-Square	
df	1

Asymp. Sig.	,127
----------------	------

Asymp. Sig.	,050
----------------	------

Histomorfometría Panorámica, estudio por materiales

T-test

Independent Samples Test

Material			Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
			F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
										Lower	Upper
4	EH_ad	Equal variances assumed	,280	,616	1,174E+00	6	,285	-,23273	,19820	-,71771	,25225
		Equal variances not assumed			1,323E+00	5,854	,235	-,23273	,17585	-,66565	,20018
	EH_ai	Equal variances assumed	1,487	,262	1,109E+00	7	,304	-,36460	,32864	-1,14172	,41252
		Equal variances not assumed			1,225E+00	5,112	,274	-,36460	,29754	-1,12446	,39526
	EH_bd	Equal variances assumed			1,380	3	,261	1,17450	,85099	-1,53372	3,88272
		Equal variances not assumed						1,17450			
	EH_bi	Equal variances assumed	2,549	,171	1,349E+00	5	,235	-,78880	,58481	-2,29210	,71450
		Equal variances not assumed			2,177E+00	4,572	,087	-,78880	,36239	-1,74717	,16957
	VSTi	Equal variances assumed	1,671	,237	-8,395E-02	7	,935	-,02495	,29719	-,72769	,67779
		Equal variances not assumed			-9,121E-02	5,814	,930	-,02495	,27356	-,69953	,64963
	VSTe	Equal variances assumed	,014	,910	2,246E+00	7	,060	-,51140	,22773	-1,04991	,02711
		Equal variances not assumed			2,274E+00	6,833	,058	-,51140	,22488	-1,04580	,02300
	HSTi	Equal variances assumed	1,933	,207	-3,353E-01	7	,747	-,10085	,30081	-,81216	,61046
		Equal variances not assumed			-3,591E-01	6,346	,731	-,10085	,28088	-,77915	,57745

	assumed									
HSTe	Equal variances assumed	,560	,479	,019	7	,985	,01455	,76048	-1,78369	1,81279
	Equal variances not assumed			,020	6,420	,984	,01455	,71170	-1,69964	1,72874
A_canal	Equal variances assumed	,990	,353	,255	7	,806	,55740	2,18708	-4,61422	5,72902
	Equal variances not assumed			,269	6,757	,796	,55740	2,07252	-4,37934	5,49414
P_canal	Equal variances assumed	2,734	,142	-8,339E-02	7	,936	-,06775	,81243	-1,98884	1,85334
	Equal variances not assumed			-9,090E-02	5,678	,931	-,06775	,74535	-1,91689	1,78139
E_cor_d	Equal variances assumed	,463	,518	-2,983E+00	7	,020	-,311900	,104563	-5,59151	-,064649
	Equal variances not assumed			-3,129E+00	6,868	,017	-,311900	,099671	-5,48504	-,075296
E_cor_i	Equal variances assumed	1,459	,266	-8,684E-01	7	,414	-,06965	,08021	-,25931	,12001
	Equal variances not assumed			-9,174E-01	6,732	,391	-,06965	,07592	-,25064	,11134
L_impl	Equal variances assumed	1,643	,241	-2,562E+00	7	,037	-,27335	,10671	-,52568	-,02102
	Equal variances not assumed			-2,411E+00	4,681	,064	-,27335	,11335	-,57080	,02410
W_impl1	Equal variances assumed	2,049	,195	-1,103E+00	7	,306	-,46550	,42187	-1,46307	,53207
	Equal variances not assumed			-1,147E+00	6,976	,289	-,46550	,40591	-1,42599	,49499
W_impl2	Equal variances assumed	1,895	,211	-1,393E+00	7	,206	-,39780	,28552	-1,07295	,27735
	Equal variances not assumed			-1,454E+00	6,937	,190	-,39780	,27355	-1,04582	,25022
A_impl	Equal variances assumed	,766	,410	-2,081E+00	7	,076	-1,92640	,92576	-4,11548	,26268
	Equal variances not assumed			-2,142E+00	6,996	,069	-1,92640	,89943	-4,05343	,20063
5	EH_ad	7,700	,032	-8,170E-01	6	,445	-,45825	,56089	-1,83069	,91419
	Equal variances			-8,170E-01	3,836	,462	-,45825	,56089	-2,04215	1,12565

	not assumed									
EH_ai	Equal variances assumed	2,086	,208	-1,816E+00	5	,129	-,78067	,42982	-1,88556	,32423
	Equal variances not assumed			-2,046E+00	4,201	,107	-,78067	,38148	-1,82010	,25877
EH_bd	Equal variances assumed	.	.	-5,866E-01	1	,662	-,63700	1,08600	-14,43589	13,16189
	Equal variances not assumed			.	.	.	-,63700	.	.	.
EH_bi	Equal variances assumed	.	.	-2,798E+00	1	,218	-1,23600	,44167	-6,84799	4,37599
	Equal variances not assumed			.	.	.	-1,23600	.	.	.
VSTi	Equal variances assumed	,970	,363	2,035	6	,088	,59800	,29393	-,12122	1,31722
	Equal variances not assumed			2,035	5,464	,093	,59800	,29393	-,13867	1,33467
VSTe	Equal variances assumed	,000	,998	,877	6	,414	,22925	,26132	-4,41017	,86867
	Equal variances not assumed			,877	5,912	,415	,22925	,26132	-4,41247	,87097
HSTi	Equal variances assumed	1,929	,224	2,154	5	,084	,60317	,28000	-,11660	1,32293
	Equal variances not assumed			2,531	3,173	,081	,60317	,23833	-,13247	1,33880
HSTe	Equal variances assumed	,725	,433	1,703	5	,149	,93600	,54955	-4,47667	2,34867
	Equal variances not assumed			1,600	3,381	,198	,93600	,58494	-,81236	2,68436
A_canal	Equal variances assumed	2,454	,178	2,158	5	,083	6,13900	2,84454	-1,17313	13,45113
	Equal variances not assumed			2,330	4,913	,068	6,13900	2,63469	-,66993	12,94793
P_canal	Equal variances assumed	,054	,826	1,924	5	,112	2,03275	1,05675	-,68371	4,74921
	Equal variances not assumed			1,942	4,600	,115	2,03275	1,04691	-,73034	4,79584
E_cor_d	Equal variances assumed	5,926	,051	1,135	6	,300	,105500	,092950	-,121942	,332942
	Equal variances			1,135	3,988	,320	,105500	,092950	-,152885	,363885

		not assumed									
	E_cor_i	Equal variances assumed	,655	,449	-1,930E+00	6	,102	-,21250	,11011	-,48194	,05694
		Equal variances not assumed			-1,930E+00	4,718	,115	-,21250	,11011	-,50071	,07571
	L_impl	Equal variances assumed	3,059	,131	-1,024E+00	6	,345	-,36300	,35449	-1,23040	,50440
		Equal variances not assumed			-1,024E+00	3,524	,371	-,36300	,35449	-1,40197	,67597
	W_impl1	Equal variances assumed	1,546	,260	-1,522E+00	6	,179	-,50950	,33482	-1,32877	,30977
		Equal variances not assumed			-1,522E+00	3,828	,206	-,50950	,33482	-1,45586	,43686
	W_impl2	Equal variances assumed	2,167	,191	-1,824E+00	6	,118	-,36800	,20176	-,86168	,12568
		Equal variances not assumed			-1,824E+00	3,516	,152	-,36800	,20176	-,95992	,22392
	A_impl	Equal variances assumed	3,708	,102	-4,398E-01	6	,675	-,70225	1,59684	-4,60958	3,20508
		Equal variances not assumed			-4,398E-01	4,195	,682	-,70225	1,59684	-5,05557	3,65107
6	EH_ad	Equal variances assumed	5,266	,062	-3,071E+00	6	,022	-,62875	,20474	-1,12974	-,12776
		Equal variances not assumed			-3,071E+00	3,144	,051	-,62875	,20474	-1,26374	,00624
	EH_ai	Equal variances assumed	4,863	,070	-2,816E+00	6	,031	-1,06200	,37719	-1,98496	-,13904
		Equal variances not assumed			-2,816E+00	3,301	,060	-1,06200	,37719	-2,20281	,07881
	EH_bd	Equal variances assumed	.	.	1,767	2	,219	1,28833	,72895	-1,84810	4,42477
		Equal variances not assumed			.	.	.	1,28833	.	.	.
	EH_bi	Equal variances assumed	.	.	-8,270E-01	2	,495	-,18200	,22008	-1,12891	,76491
		Equal variances not assumed			.	.	.	-,18200	.	.	.
	VSTi	Equal variances assumed	1,615	,251	2,912	6	,027	,61625	,21164	,09839	1,13411
		Equal variances			2,912	4,993	,033	,61625	,21164	,07200	1,16050

	not assumed									
VSTe	Equal variances assumed	2,279	,182	1,172	6	,286	,20050	,17105	-,21805	,61905
	Equal variances not assumed			1,172	4,336	,301	,20050	,17105	-,26025	,66125
HSTi	Equal variances assumed	1,039	,347	,606	6	,567	,14200	,23440	-,43155	,71555
	Equal variances not assumed			,606	5,703	,568	,14200	,23440	-,43886	,72286
HSTe	Equal variances assumed	2,395	,173	1,410	6	,208	,75800	,53753	-,55730	2,07330
	Equal variances not assumed			1,410	4,811	,220	,75800	,53753	-,64026	2,15626
A_canal	Equal variances assumed	12,485	,012	1,412	6	,208	2,72200	1,92728	-,1,99388	7,43788
	Equal variances not assumed			1,412	3,214	,247	2,72200	1,92728	-,3,18725	8,63125
P_canal	Equal variances assumed	8,374	,028	1,500	6	,184	1,00275	,66869	-,63348	2,63898
	Equal variances not assumed			1,500	3,453	,219	1,00275	,66869	-,97581	2,98131
E_cor_d	Equal variances assumed	1,841	,224	-7,448E-01	6	,485	-,029000	,038935	-,124271	,066271
	Equal variances not assumed			-7,448E-01	4,008	,498	-,029000	,038935	-,137019	,079019
E_cor_i	Equal variances assumed	3,735	,101	-1,040E+00	6	,338	-,11500	,11056	-,38553	,15553
	Equal variances not assumed			-1,040E+00	4,272	,354	-,11500	,11056	-,41442	,18442
L_impl	Equal variances assumed	1,009	,354	-5,689E-01	6	,590	-,24875	,43728	-,1,31874	,82124
	Equal variances not assumed			-5,689E-01	4,774	,595	-,24875	,43728	-,1,38899	,89149
W_impl1	Equal variances assumed	1,638	,248	-1,187E-01	6	,909	-,03025	,25489	-,65395	,59345
	Equal variances not assumed			-1,187E-01	4,874	,910	-,03025	,25489	-,69059	,63009
W_impl2	Equal variances assumed	,050	,831	-8,787E-02	6	,933	-,01825	,20770	-,52646	,48996
	Equal variances			-8,787E-02	5,714	,933	-,01825	,20770	-,53270	,49620

	not assumed										
	A_impl	Equal variances assumed	,832	,397	,138	6	,895	,21825	1,57905	-3,64555	4,08205
		Equal variances not assumed			,138	5,925	,895	,21825	1,57905	-3,65736	4,09386
7	EH_ad	Equal variances assumed	1,263	,298	-2,104E+00	7	,073	-,34325	,16311	-,72894	,04244
		Equal variances not assumed			-2,266E+00	6,165	,063	-,34325	,15151	-,71159	,02509
	EH_ai	Equal variances assumed	3,226	,116	-5,132E-01	7	,624	-,13990	,27258	-,78445	,50465
		Equal variances not assumed			-5,777E-01	4,301	,592	-,13990	,24217	-,79411	,51431
	EH_bi	Equal variances assumed	#####	,000	,820	2	,499	,73100	,89187	-3,10643	4,56843
		Equal variances not assumed			,820	1,006	,562	,73100	,89187	-10,43819	11,90019
	VSTi	Equal variances assumed	,613	,459	3,347	7	,012	1,12945	,33747	,33147	1,92743
		Equal variances not assumed			3,210	5,278	,022	1,12945	,35184	,23915	2,01975
	VSTe	Equal variances assumed	2,629	,149	2,220	7	,062	,80945	,36468	-,05288	1,67178
		Equal variances not assumed			2,085	4,617	,096	,80945	,38821	-,21390	1,83280
	HSTi	Equal variances assumed	,081	,784	2,545	7	,038	,95225	,37411	,06763	1,83687
		Equal variances not assumed			2,455	5,465	,053	,95225	,38784	-,01975	1,92425
	HSTe	Equal variances assumed	,322	,588	1,193	7	,272	,92500	,77561	-,90902	2,75902
		Equal variances not assumed			1,255	6,818	,251	,92500	,73722	-,82771	2,67771
	A_canal	Equal variances assumed	23,295	,002	2,905	7	,023	9,28610	3,19706	1,72626	16,84594
		Equal variances not assumed			2,642	3,732	,062	9,28610	3,51521	-,75592	19,32812
	P_canal	Equal variances assumed	14,405	,007	3,531	7	,010	2,71705	,76945	,89758	4,53652

	Equal variances not assumed			3,207	3,699	,037	2,71705	,84720	,28736	5,14674
E_cor_d	Equal variances assumed	,034	,859	-8,666E-01	7	,415	-,046500	,053659	-,173383	,080383
	Equal variances not assumed			-8,659E-01	6,549	,417	-,046500	,053699	-,175271	,082271
E_cor_i	Equal variances assumed	12,578	,009	-2,361E+00	7	,050	-,50555	,21410	-1,01181	,00071
	Equal variances not assumed			-2,145E+00	3,703	,104	-,50555	,23569	-1,18117	,17007
L_impl	Equal variances assumed	5,009	,060	3,499	7	,010	,96540	,27591	,31298	1,61782
	Equal variances not assumed			3,864	5,125	,011	,96540	,24988	,32777	1,60303
W_impl1	Equal variances assumed	,001	,978	2,268	7	,058	,65030	,28672	-,02768	1,32828
	Equal variances not assumed			2,280	6,691	,058	,65030	,28522	-,03050	1,33110
W_impl2	Equal variances assumed	,560	,479	2,474	7	,043	,56350	,22775	,02496	1,10204
	Equal variances not assumed			2,379	5,364	,060	,56350	,23683	-,03307	1,16007
A_impl	Equal variances assumed	,017	,901	2,079	7	,076	2,83960	1,36584	-,39010	6,06930
	Equal variances not assumed			2,119	6,925	,072	2,83960	1,34006	-,33608	6,01528

Histomorfometría Panorámica, estudio por periodos

Test of Homogeneity of Variances

Periodo		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1	VSTi	1,651	3	12	,230
	VSTe	4,666	3	12	,022
	HSTi	,816	3	12	,510
	HSTe	,475	3	12	,706
2	VSTi	,301	3	14	,824
	VSTe	,132	3	14	,939
	HSTi	3,732	3	13	,039

HSTe	,501	3	13	,688
------	------	---	----	------

ANOVA

Periodo			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	VSTi	Between Groups	1,709	3	,570	3,918	,037
		Within Groups	1,745	12	,145		
		Total	3,454	15			
	VSTe	Between Groups	1,545	3	,515	2,746	,089
		Within Groups	2,251	12	,188		
		Total	3,797	15			
	HSTi	Between Groups	2,085	3	,695	3,447	,052
		Within Groups	2,419	12	,202		
		Total	4,504	15			
	HSTe	Between Groups	8,727	3	2,909	4,571	,023
		Within Groups	7,636	12	,636		
		Total	16,363	15			
2	VSTi	Between Groups	1,167	3	,389	1,831	,188
		Within Groups	2,975	14	,212		
		Total	4,142	17			
	VSTe	Between Groups	1,087	3	,362	2,827	,077
		Within Groups	1,795	14	,128		
		Total	2,882	17			
	HSTi	Between Groups	,563	3	,188	,977	,434
		Within Groups	2,497	13	,192		
		Total	3,059	16			
	HSTe	Between Groups	9,838	3	3,279	2,542	,102
		Within Groups	16,774	13	1,290		
		Total	26,612	16			

Kruskal-Wallis Test

Material 4-5

Test Statistics^{a,b}

Periodo		VSTe	HSTi
1	Chi-Square	4,083	1,333

Material 4-6

Test Statistics^{a,b}

Periodo		VSTe	HSTi
1	Chi-Square	,750	,333

	df	1	1
	Asymp. Sig.	,043	,248
2	Chi-Square	,060	1,089
	df	1	1
	Asymp. Sig.	,806	,297

	df	1	1
	Asymp. Sig.	,386	,564
2	Chi-Square	2,940	1,500
	df	1	1
	Asymp. Sig.	,086	,221

Material 4-7

Test Statistics^{a,b}

Periodo		VSTe	HSTi
1	Chi-Square	3,000	2,083
	df	1	1
	Asymp. Sig.	,083	,149
2	Chi-Square	3,938	1,844
	df	1	1
	Asymp. Sig.	,047	,175

Material 5-6

Test Statistics^{a,b}

Periodo		VSTe	HSTi
1	Chi-Square	3,000	3,000
	df	1	1
	Asymp. Sig.	,083	,083
2	Chi-Square	2,083	,000
	df	1	1
	Asymp. Sig.	,149	1,000

Material 5-7

Test Statistics^{a,b}

Periodo		VSTe	HSTi
1	Chi-Square	,083	1,333
	df	1	1
	Asymp. Sig.	,773	,248
2	Chi-Square	2,160	,200
	df	1	1
	Asymp. Sig.	,142	,655

Material 6-7

Test Statistics^{a,b}

Periodo		VSTe	HSTi
1	Chi-Square	1,333	3,000
	df	1	1
	Asymp. Sig.	,248	,083
2	Chi-Square	,000	,540
	df	1	1
	Asymp. Sig.	1,000	,462

Histomorfometría Detallada, estudio por materiales

Test of Homogeneity of Variances

Periodo		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1	A_roscas	1,974	3	12	,172
	A_roi	2,397	3	12	,119
	BIC	2,319	3	12	,127
2	A_roscas	1,904	3	14	,175
	A_roi	2,664	3	14	,088

BIC	1,225	3	14	,337
-----	-------	---	----	------

ANOVA

Periodo			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	A_roschas	Between Groups	,003	3	,001	,379	,770
		Within Groups	,029	12	,002		
		Total	,032	15			
	A_roi	Between Groups	,007	3	,002	1,051	,406
		Within Groups	,028	12	,002		
		Total	,036	15			
	BIC	Between Groups	,007	3	,002	1,157	,366
		Within Groups	,025	12	,002		
		Total	,032	15			
2	A_roschas	Between Groups	,024	3	,008	,765	,532
		Within Groups	,145	14	,010		
		Total	,169	17			
	A_roi	Between Groups	,015	3	,005	,594	,629
		Within Groups	,116	14	,008		
		Total	,131	17			
	BIC	Between Groups	,032	3	,011	1,792	,195
		Within Groups	,083	14	,006		
		Total	,115	17			

Histomorfometría Detallada, estudio por periodos

T-Test

Group Statistics

Material	Periodo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
4	A_roschas	1	,09375	,075066	,037533
		2	,20120	,057599	,025759
	A_roi	1	,14225	,075274	,037637

		2		5	,24360	,032462	,014518
	BIC	1		4	,16350	,006137	,003069
		2		5	,25540	,041932	,018753
5	A_rosca	1		4	,06875	,027281	,013640
		2		4	,20350	,129565	,064782
	A_roi	1		4	,12500	,011165	,005583
		2		4	,26200	,113331	,056666
	BIC	1		4	,10450	,071262	,035631
		2		4	,24225	,108032	,054016
6	A_rosca	1		4	,07675	,024102	,012051
		2		4	,21825	,154388	,077194
	A_roi	1		4	,13325	,039576	,019788
		2		4	,26850	,141441	,070721
	BIC	1		4	,14475	,025591	,012796
		2		4	,23950	,084461	,042231
7	A_rosca	1		4	,10175	,052290	,026145
		2		5	,12720	,050157	,022431
	A_roi	1		4	,18125	,045595	,022798
		2		5	,19640	,057422	,025680
	BIC	1		4	,13575	,051156	,025578
		2		5	,15340	,070205	,031397

Independent Samples Test

Material	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
4 A_rosca	,282	,612	-2,440	7	,045	-,107450	,044044	-,211597	-,003303
			-2,360	5,566	,060	-,107450	,045522	-,220980	,006080
A_roi	2,799	,138	-2,744	7	,029	-,101350	,036929	-,188673	-,014027
			-2,512	3,894	,068	-,101350	,040340	-,214559	,011859
BIC	7,059	,033	-4,288	7	,004	-,091900	,021434	-,142582	-,041218

	Equal variances not assumed			-4,836	4,213	,007	-,091900	,019002	-,143622	-,040178
5	A_ro scas	3,963	,094	-2,035	6	,088	-,134750	,066203	-,296742	,027242
	Equal variances assumed			-2,035	3,265	,127	-,134750	,066203	-,336070	,066570
	Equal variances not assumed									
	A_roi	5,708	,054	-2,406	6	,053	-,137000	,056940	-,276327	,002327
	Equal variances assumed			-2,406	3,058	,094	-,137000	,056940	-,316272	,042272
	Equal variances not assumed									
	BIC	,853	,391	-2,129	6	,077	-,137750	,064709	-,296088	,020588
	Equal variances assumed			-2,129	5,195	,084	-,137750	,064709	-,302229	,026729
	Equal variances not assumed									
6	A_ro scas	4,675	,074	-1,811	6	,120	-,141500	,078129	-,332675	,049675
	Equal variances assumed			-1,811	3,146	,164	-,141500	,078129	-,383733	,100733
	Equal variances not assumed									
	A_roi	4,369	,082	-1,842	6	,115	-,135250	,073437	-,314944	,044444
	Equal variances assumed			-1,842	3,467	,150	-,135250	,073437	-,352125	,081625
	Equal variances not assumed									
	BIC	6,402	,045	-2,147	6	,075	-,094750	,044126	-,202724	,013224
	Equal variances assumed			-2,147	3,546	,107	-,094750	,044126	-,223702	,034202
	Equal variances not assumed									
7	A_ro scas	,029	,869	-,743	7	,482	-,025450	,034267	-,106478	,055578
	Equal variances assumed			-,739	6,429	,486	-,025450	,034449	-,108397	,057497
	Equal variances not assumed									
	A_roi	,378	,558	-,429	7	,681	-,015150	,035339	-,098712	,068412
	Equal variances assumed			-,441	6,996	,672	-,015150	,034339	-,096360	,066060
	Equal variances not assumed									
	BIC	,111	,748	-,419	7	,688	-,017650	,042096	-,117192	,081892
	Equal variances assumed			-,436	6,975	,676	-,017650	,040497	-,113479	,078179
	Equal variances not assumed									

ANEXO 3

Tablas de puntuación de ítems para la evaluación semicuantitativa de la respuesta de reacción al implante

		Aplasia	Pérdida de arquitectura	Estrado en zonas lejanas	Ratio grasa	Cortical	Trabecular	Contacto Ti/ recubrimiento	En médula	Entre h.cort./impl	Entre h.trab./impl	Densificada	Arterias	Osteoblastos	Osteoconducción		
Control	1 sem	1															
		2															
		3															
	2 sem	1															
		2															
		3															
	4 sem	1															
		2															
		3															
	8 sem	1															
		2															
		3															
7M:3T	1 sem	1															
		2															
		3															
	2 sem	1															
		2															
		3															
	4 sem	1															
		2															
		3															
	8 sem	1															
		2															
		3															
5V:5G	1 sem	1															
		2															
		3															
	2 sem	1															
		2															
		3															
	4 sem	1															
		2															
		3															
	8 sem	1															
		2															
		3															
5M:5G	1 sem	1															
		2															
		3															
	2 sem	1															
		2															
		3															
	4 sem	1															
		2															
		3															
	8 sem	1															
		2															
		3															

		Aplasia	Pérdida de arquitectura	Estado en zonas lejanas	Ratio grasa	Cortical	Trabecular	Contacto TI/ recubrimiento	En médula	Entre h.cort./impl	Entre h.trab./impl	Densificada	Arterias	Osteoblastos	Osteoconducción	
Control	1 sem	1														
		2														
		3														
		4														
	2 sem	1														
		2														
		3														
		4														
7M:3T	1 sem	1														
		2														
		3														
		4														
	2 sem	1														
		2														
		3														
		4														
7M:3T+0,9%Gel	1 sem	1														
		2														
		3														
		4														
	2 sem	1														
		2														
		3														
		4														
3X	1 sem	1														
		2														
		3														
		4														
	2 sem	1														
		2														
		3														
		4														