



Estudio de la correlación entre parámetros histomorfométricos y de valoración de la estabilidad de los implantes. Nuevo método de determinación del BIC basado en imágenes BS-SEM

Carolina Manresa Quirante

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



ODONTOLOGIA INTEGRADA D'ADULTS
DEPARTAMENT D'ODONTOESTOMATOLOGIA
FACULTAT D'ODONTOLOGIA

Programa de Doctorat: Ciències Odontològiques

**Estudio de la correlación entre parámetros histomorfométricos
y de valoración de la estabilidad de los implantes. Nuevo
método de determinación del BIC basado en imágenes BS-SEM**

Memoria presentada por *Carolina Manresa Quirante* para optar al
Grado de Doctor en Odontología

Bajo la dirección de los doctores:

José Javier Echeverría
M^a Cristina Manzanares

Barcelona 2014

El trabajo recogido en esta memoria se ha realizado en el Departamento de Odontoestomatología, Unidad de Odontología Integrada de Adultos, Facultad de Odontología, Campus de Bellvitge, Universidad de Barcelona, desde octubre de 2008 hasta noviembre de 2013 bajo la dirección del Dr. José Javier Echeverría y de la Dra. M^a Cristina Manzanares.

Para la realización de esta tesis doctoral se ha contado con la generosa ayuda de la empresa Biohorizons Inc.



José Javier ECHEVERRÍA GARCÍA, Catedràtic de Periodòncia del Departament d'Odontostomatologia de la Facultat d'Odontologia, Universitat de Barcelona.

M^a Cristina MANZANARES CÉSPEDES, Professora Titular d'Universitat, de la Unitat d'Anatomia i Embriologia Humana del Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

FAN CONSTAR

Que la Sra. Carolina MANRESA QUIRANTE ha dut a terme la Tesi Doctoral sota el títol "Estudio de la correlación entre parámetros histomorfométricos y de valoración de estabilidad de los implantes. Nuevo método de determinación del BIC basado en imágenes BS-SEM" sota la direcció dels Professors Dr. José Javier Echeverría García i Dra. M^a Cristina Manzanares Céspedes.

Que la Tesi compleix tots els requisits per ser presentada, defensada i qualificada davant del Tribunal que oportunament es nomeni.

Prof. Dra. MC Manzanares Céspedes

Prof. Dr. JJ Echeverría García

L'Hospitalet, 9 de Desembre del 2013

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a:

Los directores de esta Tesis Doctoral, el Dr. José Javier Echeverría y la Dra. M^a Cristina Manzanares. Al Dr. Echeverría, a quien le debo mis conocimientos en periodoncia y osteointegración, por su gran dedicación a la dirección de la tesis, y porque junto a la Dra. Carolina Manau, me han inculcado la odontología basada en la evidencia y la práctica clínica interdisciplinar, como el camino para alcanzar un estado idóneo de salud bucodental a largo plazo. A la Dra. Manzanares, por sus fructíferos consejos, por su dedicación a la dirección de la tesis y por haber compartido conmigo su valiosa experiencia en el procesado de las muestras y en la utilización del microscopio electrónico (BS-SEM), decisivo para la obtención de las imágenes.

El Dr. Manel Bosch, técnico de la Unitat de Microscopia Óptica Avanzada (CCiTUB), por su inestimable contribución en el procesado de las imágenes de BS-SEM informáticamente y el cálculo de los valores de BIC% por el nuevo método.

El Dr. Manolo Bravo, por su desinteresada colaboración en la revisión de la parte estadística de las dos publicaciones que conforman esta Tesis Doctoral.

El Dr. Carles Subirà y la Dra. Marta Pastor (compañera inseparable de Licenciatura y Máster), por su generosa ayuda en el animalario durante la parte experimental de este proyecto.

Mis compañeros del Máster de Odontología Integrada de Adultos, con especial atención a: Marta Pastor, , Gemma Ballestar, Elena López, Sergi Pedemonte, Elena Sanz, Sergio García, Marià Santamaría, Toni Pijoan, Anna Fuertes, Belén González, Iván Mendoza, Jaume Girons, Mariona Gamell, Laura Hornos, Marta Troyano, Ana Fuentes e Ismene Gil.

Todos mis familiares y amigos, por su apoyo a lo largo de la elaboración de esta Tesis Doctoral. Sin ellos, no hubiera sido posible.

A Fina, Antonio, Elena y Jordi.

*El secreto de la felicidad no es hacer
siempre lo que se quiere,
sino querer siempre lo que se hace.*
Tolstoi



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la correlación entre parámetros histomorfométricos
y de valoración de la estabilidad de los implantes. Nuevo
método de determinación del BIC basado en imágenes BS-SEM**

Programa de Doctorat: Ciències Odontològiques

Autor:

Carolina Manresa Quirante

Co-dirigida por:

Prof. Dr. José Javier Echeverría

Prof. Dra. M^a Cristina Manzanares

NOTA ACLARATORIA

Ni el doctorando ni los directores de este trabajo de Tesis Doctoral manifiestan tener conflicto de interés, ya sea directamente o indirectamente, en ninguno de los productos nombrados en este estudio.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Implantología: antecedentes y estado de la cuestión	3
1.2. Estabilidad primaria y secundaria	4
1.3. Métodos descritos para medir la estabilidad de un implante	7
1.3.1. Métodos no-invasivos	8
1.3.1.1. Percepción del cirujano.....	8
1.3.1.2. Torque de inserción	9
1.3.1.3. Prueba de percusión	9
1.3.1.4. Evaluación radiográfica. Tomografía computarizada cuantitativa (QCT)	10
1.3.1.5. Periotest®	10
1.3.1.6. Análisis de frecuencia de resonancia (AFR).....	11
1.3.2. Métodos invasivos	14
1.3.2.1. Prueba del torque inverso	14
1.3.2.2. Evaluación histomorfométrica de la interfase hueso- implante.....	15
1.4. Alternativas al microscopio óptico para la evaluación histomorfométrica	16
1.4.1. Microscopio electrónico de barrido (SEM).....	16
1.4.2. Microscopio de rastreo laser confocal (CLSM).....	18
1.4.3. Desventajas del método clásico basado en el microscopio óptico.....	19
1.5. Intentos de correlacionar valores de ISQ y parámetros histomorfométricos.....	21
Capítulo 2. Objetivos de la Tesis Doctoral	23
2.1. Objetivos primarios.....	25
2.1. Objetivos secundarios	25
Capítulo 3. Material y Métodos	27
3.1. Implantes (<i>Artículos I y II</i>).....	29
3.2. Animales de experimentación (<i>Artículos I y II</i>)	29
3.3. Procedimiento quirúrgico (<i>Artículos I y II</i>)	30
3.4. Mediciones de Frecuencia de Resonancia (AFR): Osstell Mentor® (<i>Artículo II</i>)	31
3.5. Preparación de las muestras (<i>Artículos I y II</i>)	32

3.6. Adquisición de las imágenes mediante microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersados (BS-SEM, <i>Artículo I</i>)	33
3.7. Procesado de las imágenes y determinación del BIC % (<i>Artículo I</i>)	33
3.8. Análisis estadístico (<i>Artículo II</i>)	35
Capítulo 4. Resultados	37
4.1 Cicatrización y movilidad de los implantes	39
4.2. Artículo I	39
4.2.1. Microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersados (BS-SEM)	39
4.2.2. Determinación del BIC mediante imágenes BS-SEM.....	40
4.3. Artículo II	42
4.3.1. Determinación de los valores de ISQ mediante AFR	42
4.3.2. Correlación entre los valores de ISQ y BIC%	43
Capítulo 5. Discusión	45
5.1. Ventajas del método propuesto de obtención del BIC% en relación a los métodos previamente descritos	47
5.2. Intentos previos en la correlación de parámetros histomorfométricos y AFR.....	48
5.3. Ausencia de correlación entre ISQ y BIC%.....	51
5.3. 2D BIC% vs. 3D BIC%	53
Capítulo 6. Conclusiones	55
Capítulo 7. Artículos publicados	59
7.1. Manresa, C., Bosch, M., Manzanares, M. C., Carvalho, P.; Echeverría, J. J (2013) A new standardized-automatic method for bone-to-implant contact histomorphometric analysis based on backscattered scanning electron microscopy images. <i>Clinical Oral Implant Research</i> xx : xx-xx.	61
7.2. Manresa, C., Bosch, M., Echeverría, J. J. (2013) The comparison between implant stability quotient and bone-implant contact revisited: an experiment in Beagle dog mandible. <i>Clinical Oral Implant Research</i> xx : xx-xx.	69

Bibliografía	81
Abreviaturas	95
Listado de Tablas	97
Listado de Figuras	99

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Implantología: antecedentes y estado de la cuestión

Desde que Branemark acuñó el término “osteointegración” tras su descubrimiento accidental en 1952, el uso de implantes dentales osteointegrados ha cobrado un gran impulso, sobre todo en los últimos 20 años. Los implantes dentales han revolucionado el modo en que actualmente se reemplazan los dientes perdidos. En la actualidad, el tratamiento con prótesis implanto-soportadas, se ha convertido en una alternativa a los tratamientos convencionales en la rehabilitación de pacientes edéntulos y parcialmente edéntulos presentando tasas de éxito y supervivencia elevadas a lo largo del tiempo (Lindquist et al. 1996; Ekelund et al. 2003; Jemt y Johansson 2006; Lekholm et al. 2006; Astrand et al. 2008) y mostrando unos índices significativos de satisfacción por parte de los pacientes (Pjetursson et al. 2005).

A diferencia de otros implantes utilizados en todo el cuerpo humano, el implante dental presenta una característica única: se fija al hueso a la vez que presenta conectado fuera del cuerpo, en la cavidad oral, un elemento protésico (diente). La encía circundante forma una barrera entre los dos entornos.

La investigación y el desarrollo en el campo de la implantología están constantemente enfocados en el rediseño del implante y la modificación de cualquiera de sus propiedades químicas o mecánicas, tales como topografía, superficie, diseño macro y microscópico, etc. Actualmente se han descrito más de 1300 tipos de implantes dentales con la finalidad de mejorar el éxito del implante,

mejorar la respuesta del tejido óseo y acelerar el proceso de curación (Lesmes y Laster 2011).

El protocolo original de cirugía implantológica, consiste en proporcionar al implante un periodo de cicatrización inicial, de aproximadamente 6 meses, antes de ser conectado al medio oral y de conferirle una función masticatoria, lo que se conoce como carga diferida, mediante la prótesis definitiva. En la actualidad, cada vez más se tiende a acortar el tiempo de carga de los implantes, siendo la carga inmediata o temprana una práctica cada vez más extendida, de modo que se restablece la estética y función de nuestros pacientes en cuestión de horas o unos pocos días (Engquist et al. 2005; De Smeth et al. 2007; Fischer et al. 2009). La decisión sobre si cargar o no los implantes en esos tiempos se basa en la valoración de la estabilidad. La estabilidad del implante tras su inserción es, entre otras variables, el factor más importante para su osteointegración. No obstante, el éxito a largo plazo en implantología, no depende sólo de lograr dicha estabilidad.

1.2. Estabilidad primaria y secundaria

La estabilidad del implante se podría definir como la capacidad de soportar cargas en dirección axial, lateral y rotacional, con lo que la estabilidad de un implante se puede medir en diferentes direcciones (Sennerby et al. 1998; Scarano et al. 2006). Se diferencia entre dos tipos de estabilidad: la “estabilidad primaria” y la “estabilidad secundaria”. La primera se define como la sujeción mecánica inicial del implante tras su colocación (Lioubavina-Hack et al. 2006), y está principalmente determinada por el contacto inicial hueso-implante. (Andrés-García et al. 2009). La estabilidad secundaria hace referencia a la estabilidad del implante después del proceso de curación primaria. Su aumento depende de la estabilidad biológica, la cual es el resultado de la formación de nuevas células óseas en el lugar del implante y la osteointegración.

El fenómeno de osteointegración implica una serie de procesos fisiológicos de reabsorción y aposición ósea, que determinan la formación ósea alrededor del implante, permitiendo una mejor unión entre hueso e implante. (Andrés-García et al. 2009).

La estabilidad del implante es el principal parámetro que determina la programación (calendario) de carga del implante y el éxito del tratamiento (Safin y Berman 1991; Chiapasco et al. 1997; Lazzara et al. 1998; Szmucier-Moncler et al. 1998; Testori et al. 2002). Los factores que afectan la estabilidad primaria (Tabla 1.1) son: la cantidad y calidad ósea, la técnica quirúrgica (incluyendo las habilidades y experiencia del cirujano) y el tipo de implante (geometría, longitud, diámetro y tipo de superficie).

Tabla 1.1. Factores que influyen en la estabilidad primaria.

Factores	Modalidades
1. Cantidad y calidad ósea	Clasificación en tipos de hueso según su densidad, presencia de hueso cortical, densidad de la trabeculación ósea.
2. Técnica quirúrgica	Técnica de inserción (fresado no homogéneo, pérdida del eje axial durante el fresado, etc.), congruencia entre el implante y la preparación del lecho óseo, anclaje bicortical, implantes post-extracción, experiencia del profesional.
3. Características del implante	Morfología: cónico, cilíndrico, separación entre espiras, diámetro, longitud, tipo de superficie, etc.

Por otra parte, los factores que afectan la estabilidad secundaria (Tabla 1.2) son: la estabilidad primaria, la regeneración y remodelación ósea y las condiciones de la superficie del implante (Meredith 1998b; Atsumi et al. 2007).

Tabla 1.2. Factores que influyen en la estabilidad secundaria.

Factores
1. Estabilidad primaria
2. Regeneración y curación ósea
3. Condiciones de la superficie del implante
4. Propiedades mecánicas del tejido óseo

La estabilidad mecánica es generalmente más alta inmediatamente después de la colocación del implante, debido a la compresión mecánica del hueso cuando éste

se coloca, y disminuye a lo largo de las siguientes semanas. Por otra parte, la estabilidad biológica no existe inmediatamente después de su implantación. Se hace evidente con la aparición de nuevas células óseas y va en aumento con el paso del tiempo. En otras palabras, como resultado de la osteointegración la estabilidad mecánica inicial se complementa y/o es reemplazada por la estabilidad biológica, de tal manera que el nivel de estabilidad final de un implante es la suma de ambas (Fig. 1.1). Después de la colocación de un implante es probable que se produzca un descenso inicial en la estabilidad seguida de un aumento por el cual el implante se convierte en biológicamente estable.

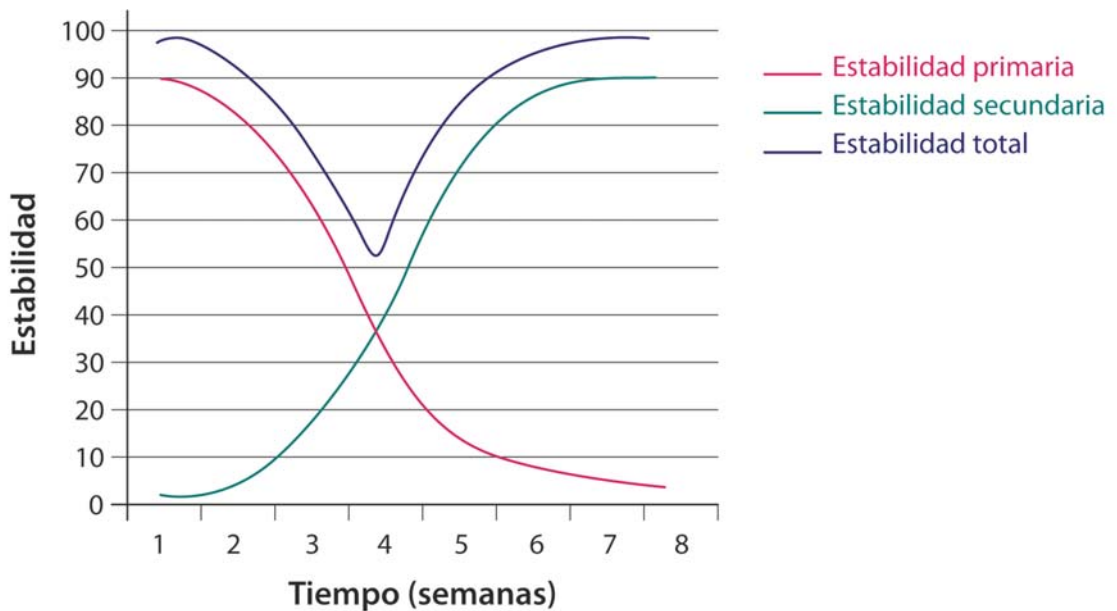


Fig. 1.1. Cambio de la estabilidad primaria en el momento de la colocación del implante a la estabilidad secundaria obtenida por deposición de nuevo hueso (osteointegración) en humanos (Raghavendra et al. 2005).

Si la estabilidad primaria es muy elevada, situación muy común cuando los implantes se colocan en hueso denso, es probable que sólo se produzca un modesto incremento de la estabilidad secundaria, ya que la mayor parte de la superficie del implante está en contacto con el hueso desde el inicio. En cambio en situaciones de baja densidad ósea y poca estabilidad primaria, el proceso de cicatrización puede añadir considerable estabilidad secundaria, aunque en estos casos el periodo de cicatrización será más largo (Sennerby y Meredith 1998).

Las propiedades mecánicas del tejido óseo están determinadas por la composición del hueso en el lugar del implante y pueden aumentar durante el periodo de curación/cicatrización debido a que el hueso trabecular tiende a estar sometido a una transformación en hueso cortical denso en la vecindad de la superficie del implante (Sennerby y Meredith 2008).

El proceso de curación resulta de la formación ósea que establece puentes óseos entre la superficie del implante y el hueso circundante (Sennerby y Meredith 2008). En las mejores circunstancias el hueso crece hacia y en la superficie del implante, con lo que se refuerza la interfase entre el hueso y la superficie implantaria (Östman et al. 2006).

La inmovilidad clínica de un implante se consigue a nivel del hueso cortical (estabilidad primaria) y a nivel del hueso trabecular (estabilidad secundaria). Una estabilidad primaria segura puede predecir una estabilidad secundaria. Se ha demostrado que la estabilidad secundaria aumenta después de 4 semanas de la colocación del implante. Lo que explica, por tanto, que el protocolo original de Branemark sugiera un periodo de curación de 3 a 6 meses sin cargar el implante para conseguir una adecuada estabilidad antes de la carga funcional (Atsumi et al. 2007).

1.3. Métodos descritos para medir la estabilidad de un implante

La medición objetiva de la estabilidad del implante ofrece con toda claridad importantes ventajas:

- Ayuda a tomar las decisiones correctas sobre cuándo cargar el implante.
- Permite elegir el protocolo más favorable según cada situación.
- Indica situaciones en las cuales es mejor retirar el implante.
- Contribuye a una mejor comunicación entre clínicos y aumenta la confianza.
- Proporciona una mejor documentación de los casos.

Con el paso de los años se han utilizado varios métodos (invasivos y no-invasivos) para medir la estabilidad de un implante con diferentes grados de éxito (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Métodos para medir la estabilidad de un implante: no-invasivos e invasivos.

Métodos para medir la estabilidad	
NO-INVASIVOS	<ul style="list-style-type: none"> • Percepción del cirujano • Torque de inserción • Prueba de percusión • Evaluación radiográfica. QCT. • Periotest[®] • AFR
INVASIVOS	<ul style="list-style-type: none"> • Prueba del torque inverso • Evaluación histomorfométrica de la interfase hueso-implante <ul style="list-style-type: none"> BIC (<i>Bone-to-Implant Contact</i>) BVD (<i>Bone Volume Density</i>) EIL (<i>Effective Implant Length</i>)

1.3.1. Métodos no-invasivos

1.3.1.1. La percepción del cirujano

Intenta evaluar la estabilidad primaria. Se basa en la resistencia al corte y al torque de asentamiento del implante durante su inserción. El torque se define como una fuerza o combinación de fuerzas que producen un movimiento de torsión o rotación (Norman 2007). La percepción de una “buena” estabilidad puede ser mayor por la sensación de una parada brusca cuando se asienta el implante. La geometría de un implante cónico forzará más las roscas del implante en contacto directo con el hueso circundante y ocasionará una parada firme, lo que se percibe como una alta estabilidad (Sennerby y Meredith 2008).

La percepción de un cirujano experto es por supuesto inestimable y bajo ningún concepto debe ser ignorada. Sin embargo, la percepción obviamente no se puede cuantificar, ni comunicar consistente y efectivamente a otros, ni tampoco utilizarse como base de futuras comparaciones. En los casos de mayor riesgo, apoyarse en la percepción no es suficiente para asegurar resultados positivos de un tratamiento. Pero lo más importante es que este tipo de medición solo puede llevarse a cabo cuando se ha insertado el implante y no se puede utilizar más tarde (Degidi et al. 2010).

1.3.1.2. Torque de inserción

Medir el torque de inserción cuando se instala el implante es un intento de cuantificar la percepción táctil del cirujano. Es la fuerza de torsión final en la inserción de un implante, medida en Ncm (Newton centímetro). Una desventaja de éste método es que el torque de inserción varía dependiendo de las propiedades de corte del implante y de la presencia de fluidos en la preparación. Sin embargo, el método obtiene información sobre la energía utilizada en la instalación del implante. Nos proporciona una medición única y no repetible. Para aplicar este método normalmente se utiliza un motor electrónico desarrollado para llevar a cabo la perforación ósea, la colocación del implante y la conexión con el pilar (Atsumi et al. 2007). Su principal desventaja es que, al igual que la percepción del cirujano, las mediciones del torque de inserción sólo pueden utilizarse cuando el implante se inserta y no es posible en el proceso de tratamiento y seguimiento (Frieberg et al. 1999).

1.3.1.3. La prueba de percusión

Este método consiste en golpear suavemente el porta-implantes con una herramienta (el mango de un espejo de exploración) y escuchar un (“buen”) sonido. Si el sonido es timpánico, es señal de una buena osteointegración; pero, en cambio, un sonido mate es indicativo de un fallo en la osteointegración del implante. Es un método muy subjetivo y depende en gran medida de la experiencia clínica del profesional (Sennerby y Meredith 2008).

1.3.1.4. Evaluación radiográfica. Tomografía Computarizada Cuantitativa (QCT *Quantitative Computed Tomography*)

La evaluación radiográfica es un método semi-invasivo que se puede realizar en cualquier etapa de la cicatrización. Las radiografías son importantes antes y después de la implantación para evaluar el tejido óseo del huésped, dónde se va a instalar el implante y las reacciones del tejido alrededor del implante durante su seguimiento. No obstante, este método presenta ciertas limitaciones: las radiografías tienen una resolución bastante baja y si se pretende hacer un seguimiento con revisiones periódicas suponen una dosis continua de radiación para el paciente. Sin embargo, la Tomografía Computarizada Cuantitativa, también llamada Microtomografía Computarizada (μ CT, *Micro-Computed Tomography*) permite analizar la interfase alrededor del implante. Es un método preciso y reproducible de la densidad mineral del hueso *in vivo*. En relación a los métodos histomorfométricos, la QCT no ofrece la resolución espacial para un análisis preciso de la estructura del hueso (Martínez et al. 2001). Otras desventajas que presenta son: 1) una cierta exposición a radiación, y 2) que los resultados pueden estar afectados por la vecindad de componentes metálicos al sitio de análisis.

1.3.1.5. Periotest®

Originalmente fue diseñado para medir la movilidad dental y posteriormente se ha utilizado para cuantificar la estabilidad implantaria (Aparicio 1997, Schulte y Lukas 1993, Isidor 1998). Consiste en una pequeña computadora conectada a una pieza de mano, que contiene una barra en su interior. Usando un acelerador magnético la barra golpea el diente o el implante 4 veces por segundo a una velocidad de 2 m/s. La computadora transforma la respuesta del objeto percutido en valores Periotest® (PTV). Estos valores van desde -8, para la máxima estabilidad, hasta 50, para la máxima movilidad clínica. El Periotest® sirve para evaluar la capacidad de amortiguación del diente o el implante, pero no siempre es posible realizar mediciones en sentido mesio-distal. Además, parece insuficiente para detectar pequeños cambios en la estabilidad del implante, porque la dirección y posición del instrumento afecta los valores resultantes.

1.3.1.6. Análisis de Frecuencia de Resonancia (AFR)

Meredith et al. (1996) describieron un procedimiento clínico no-invasivo llamado Análisis de Frecuencia de Resonancia (AFR), para la evaluación de la estabilidad de los implantes. Consiste en evaluar el anclaje alrededor de un implante (Fig. 1.2) midiendo la frecuencia de resonancia de un transductor acoplado al implante (Meredith et al. 1996; Meredith et al. 1997a; Meredith et al. 1997b). El AFR es un procedimiento ampliamente usado en mecánica para evaluar la estabilidad de estructuras. Se basa en el principio del diapasón: cuanto más rígida es la interfase, mayor es la frecuencia. En odontología, el instrumento original Osstell® (2001), es un

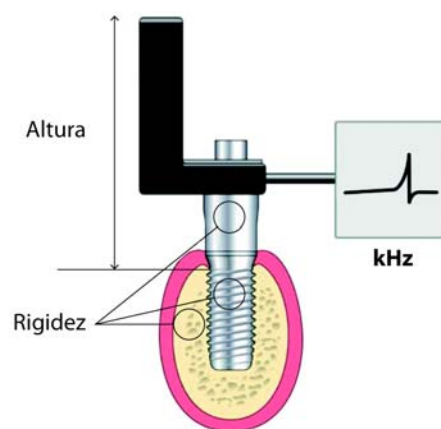


Fig. 1.2. Esquema de la técnica AFR (Sennerby y Meredith 1998). En negro, el transductor atornillado al implante.

elemento piezoeléctrico con un espectro de frecuencia de 3.500-8.000 Hz. La frecuencia con la amplitud máxima se aplica para calcular el llamado cociente de estabilidad del implante (ISQ, *Implant Stability Quotient*,) en una escala del 0 al 100. De acuerdo con el fabricante, existe una relación casi lineal entre los valores de AFR y los de ISQ. El ISQ representa el grado de estabilidad del implante (la rigidez de la interfase entre el implante y el hueso que lo rodea) en la dirección explorada. Cuanto mayor es el ISQ, mayor es la estabilidad.

Actualmente hay disponibles varias versiones de aparatos de AFR: el original, tal como se ha mencionado anteriormente es un aparato electrónico (Osstell®), mientras que los más recientes son aparatos magnéticos sin cables (Osstell Mentor® y Osstell ISQ®). Se ha puesto de manifiesto que el uso de los aparatos magnéticos en comparación con el predecesor electrónico ha determinado una mejora en la precisión de la técnica (Atsumi et al. 2007, Valderrama et al. 2007).

En todas sus versiones, su uso es muy sencillo. Se enrosca al implante un aditamento, transductor o SmartPeg[®], diseñado específicamente para este uso. En las versiones magnéticas, la cabeza del SmartPeg[®] se activa por pulsos magnéticos realizados desde el transductor del terminal del aparato (Fig. 1.3). Al mismo tiempo, el terminal analiza la frecuencia del SmartPeg[®] y da el valor de estabilidad. Cuanto mayor es la frecuencia, mayor es la estabilidad y mayor es el índice ISQ que da el aparato. Normalmente se hacen dos mediciones mínimas. Una desde mesial y otra desde vestibular (a 90 grados de la previa). Así se obtienen valores desde distintas posiciones que proporcionarían una valoración real de la estabilidad del implante. En la mayoría de ocasiones, de ambas mediciones se obtienen valores muy similares o iguales; salvo en situaciones desfavorables de deficiente calidad ósea o procedimientos de injertos óseos, en las que podemos objetivar situaciones de riesgo que de otra manera pasarían desapercibidas.

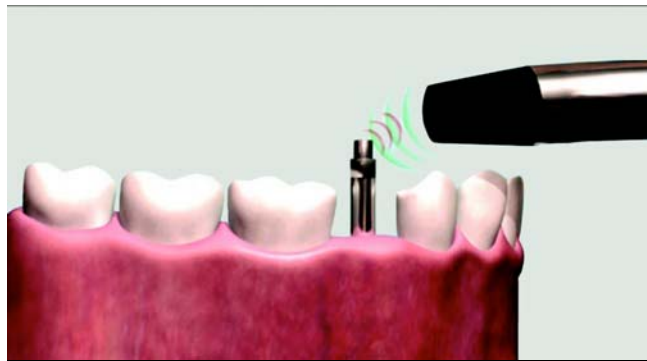


Fig. 1.3. Esquema de la medición de valores ISQ con la versión magnética de Osstell[®]. Fijación al implante del aditamento SmartPeg[®] correspondiente. (The Implant Stability Quotient Whitebook, en <http://www.isqforum.com>; 1/10/2013)

El AFR es considerado superior a otros sistemas de análisis (radiográficos, torque de inserción, Periotest[®]) durante el proceso de osteointegración y su seguimiento (Aksoy et al. 2009; Turkyilmaz 2006, Lachmann et al. 2006a, Lachmann et al. 2006b). Las mediciones de la estabilidad de un implante a través del AFR reducen los errores dependientes del observador que ocurren con el Periotest[®], ya que el transductor se enrosca en el implante y las mediciones están completamente automatizadas. El torque que se usa en la fijación del transductor o el SmartPeg[®] al implante no parece alterar los resultados de las mediciones de AFR y los resultados obtenidos con este tipo de medición, son muy reproducibles (Meredith et al. 1996,

Lachmann et al. 2006a, Lachmann et al. 2006b, Bischof et al. 2004). El AFR se utiliza cada vez más en implantología clínica como herramienta para medir la estabilidad primaria y por consiguiente como un indicador de las posibilidades de llevar a cabo una carga temprana o inmediata en los implantes.

Es muy importante subrayar que la gran ventaja del procedimiento es que al no ser invasivo no afecta en absoluto a la estabilidad del implante. En el apartado 1.2 de esta introducción se ha comentado que la estabilidad inmediata del implante, mecánica pura, se va sustituyendo durante el periodo de osteointegración por una estabilidad biológica. Hay un descenso inicial de esta estabilidad en el periodo inmediato a la cirugía, aumentando progresivamente al desarrollarse el proceso biológico de osteointegración. Si la evolución clínica es favorable, los valores de ISQ bajos tienden a ir aumentando con el tiempo, precisamente por este proceso biológico. Se consideran de riesgo los valores ISQ inferiores a 55; los superiores a 70 se consideran valores adecuados (Fig. 1.4). En circunstancias desfavorables se recomienda monitorizar la evolución clínica del implante, usar tiempos de osteointegración mayores y/o extremar las precauciones a la hora de cargar el implante y decidir el diseño de la prótesis. El valor de estabilidad considerado como estándar y reflejo de una adecuada osteointegración se establece en 70 ISQ. Si se han obtenido valores iniciales adecuados, pero la evolución del valor en el periodo de osteointegración desciende considerablemente, se puede estar ante una situación de fracaso del implante y, por tanto, debe considerarse un signo de alarma ante el que es necesario actuar precozmente (Sennerby y Meredith 2008; Östman, et al. 2005; Sjöström, et al. 2007; Glauser, et al. 2004).

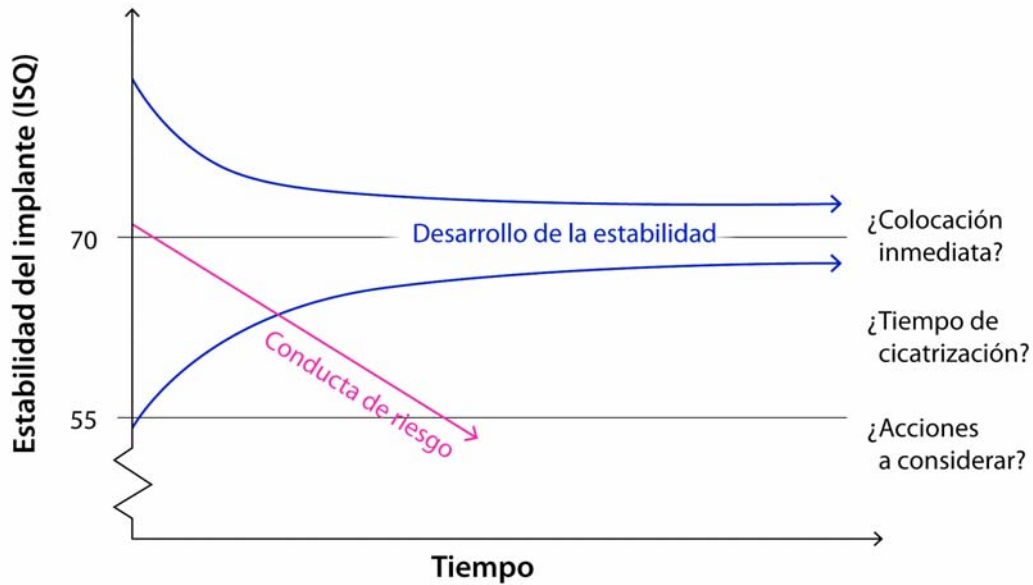


Fig. 1.4. Posibles escenarios en la progresión de la estabilidad de un implante en términos ISQ, expresado en el tiempo. Las líneas azules convergentes muestran las dos opciones más probables, con una estabilidad del implante, eventualmente llegando alrededor de los 70 ISQ. a) Valor inicial ISQ elevado que tiende a disminuir, a medida que la estabilidad mecánica es substituida por la estabilidad biológica. b) Valor inicial de estabilidad bajo que tiende a aumentar a medida que la osteointegración progresa. En el caso de la recta color rojo, la osteointegración no progresa según lo planificado, y puede resultar en la pérdida del implante. (The Implant Stability Quotient Whitebook, en <http://www.isqforum.com>; 1/10/2013)

1.3.2. Métodos invasivos

1.3.2.1. Prueba del torque inverso

Método invasivo para determinar la estabilidad de los implantes que se basa en determinar la fuerza anti-horaria necesaria para desenroscar el implante del hueso. Se ha utilizado extensamente para cuantificar la fuerza de torsión del hueso en contacto con el implante en estudios con animales. Sin embargo, este método ha caído en desprestigio por varias razones. Los implantes que giran, cuando se aplica el torque inverso se desinsertan. Además, la presión misma que se aplica con el torque inverso puede ser propiamente la responsable del fracaso del implante cuando éste aún está en proceso de osteointegración (Atsumi et al. 2007; Cavit et al. 2009; Sullivan et al. 1996). Por otro lado, los trabajos con animales han demostrado la reintegración de implantes móviles sueltos y que rotan (Ivannoff et al. 1996). Finalmente, la medición de la movilidad lateral es más útil que la medición de la

movilidad rotacional como indicador del resultado óptimo a un tratamiento. Un implante móvil que rota puede ser lateralmente estable y las pruebas de torque inverso no miden, o no tienen en cuenta, la movilidad lateral.

1.3.2.2. Evaluación histomorfométrica de la interfase hueso-implante

Lógicamente, este método necesita de la obtención en bloque del implante y su hueso circundante, por lo que es mayoritariamente un procedimiento limitado a estudios experimentales con animales. La evaluación histológica e histomorfométrica del hueso adyacente al implante dental puede llevarse a cabo bajo la observación con: 1) microscopía óptica (microscopio óptico, método clásico), 2) microscopía de barrido laser confocal (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscopy*) y 3) microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*). Las muestras utilizadas para la evaluación histológica e histomorfométrica se basan en secciones pulidas fijadas y embebidas en una resina.

La metodología para obtener las secciones pulidas no-descalcificadas de bloques de hueso e implante fue descrita a principio de los ochenta por Donath y Breuner (1982) y sigue siendo en la actualidad el método generalmente utilizado para el procesado de las muestras para estudiar la interacción hueso-implante. Dicho método consiste en fijar el tejido, deshidratarlo con etanol y embeberlo en resina. Una vez obtenido el bloque de resina, la muestra se sierra y divide en 2 secciones siguiendo el eje longitudinal del implante. Cada sección se pule para conseguir una sección todavía más fina. Es importante tener en cuenta la dirección del serrado y el grosor de las secciones pulidas (Johansson y Morberg 1995a; Johansson y Morberg 1995b). Se han descrito y evaluado diferentes resinas poliméricas tales como epoxi, metil, metacrilato y poliéster (Hipp et al. 1987; Kihara et al. 1989; Pasyk y Hassett 1989). La polimerización generalmente se lleva a cabo mediante tratamiento con calor o luz UV, o añadiendo un acelerador a la resina, que da lugar a un bloque endurecido. La dureza será diferente según el polímero, el método de polimerización, etc. Para el análisis de las muestras por microscopía óptica, después del pulido de la sección se procede a su tinción con diferentes colorantes (fucsina básica, azul de metileno, hematoxilina-eosina, etc.).

El análisis subsecuente de las secciones pulidas y teñidas con el microscopio de luz, permite evaluar la histología alrededor del implante de forma cualitativa y cuantitativa.

1.4. Alternativas al microscopio óptico para la evaluación histomorfométrica

1.4.1. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Desde su desarrollo en la década de los cincuenta, el microscopio electrónico de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) ha favorecido nuevas áreas de estudio en comunidades científicas, médicas y físicas, lo que ha permitido a los investigadores examinar una variedad enorme de especímenes.

El SEM es un microscopio que utiliza electrones en lugar de luz visible para formar una imagen. Esto le confiere actualmente la mayor resolución de imagen posible. El nivel de resolución de un microscopio está limitado por la longitud de onda del medio usado para la formación de las imágenes (luz o electrones). La luz visible tiene por definición una longitud de onda fija entre 200-500 nm (del rojo al azul). Los electrones tienen el mismo tipo de estructura de onda que la luz visible, pero su longitud de onda puede variar con la velocidad. Aumentando los voltajes de aceleración, la longitud de onda es más pequeña y por consiguiente mayor el nivel de resolución. Otras de las ventajas que ofrece el SEM sobre los microscopios tradicionales es la gran profundidad de campo, lo que permite tener en el foco a más de un espécimen a la vez. Debido a que el SEM utiliza electroimanes en lugar de lentes, el investigador tiene mucho más control sobre el grado de ampliación. Todas estas ventajas, así como las imágenes, sorprendentemente claras y reales, hacen que el microscopio electrónico de barrido sea uno de los instrumentos más útiles en investigación hoy en día.

El SEM se compone de un cañón de electrones, que actúa como emisor o “fuente de iluminación” (para hacer una analogía con la microscopía óptica); un sistema de lentes, encargado de focalizar el haz de electrones producido por el emisor y convertirlo en un haz de sección transversal muy pequeña cuando llega a la superficie de la muestra; un sistema de barrido, que lo hace recorrer la superficie de la muestra; uno o varios sistemas de detección, que permiten captar el resultado de la interacción del haz de electrones con la muestra en forma de señal eléctrica, y

diversos sistemas que permiten observar el resultado de la inserción en el proceso de barrido. Además, para que el conjunto funcione adecuadamente, es preciso que se cumplan unos determinados requisitos de vacío, para evitar las interacciones entre los electrones y las moléculas de gas (Fig. 1.5).

Para generar la imagen, el SEM produce en la parte superior del microscopio un haz de electrones enfocado y altamente acelerado que sigue una trayectoria vertical. El rayo viaja al vacío a través de los campos y lentes electromagnéticas, que concentran el haz hacia abajo, hacia la muestra. Una vez que el rayo golpea la muestra, los electrones y los rayos X son expulsados de la muestra. Los detectores recogen estos rayos X, electrones retrodispersados y electrones secundarios y los convierten en una señal que se envía a una pantalla similar a la de un televisor. La imagen resultante tendrá contrastes diversos debido a diferencias en el grosor de la muestra (contraste de masa-grosor), número atómico (contraste-z), orientación del cristal (contraste de difracción) e interferencias de las ondas (contraste de fase).

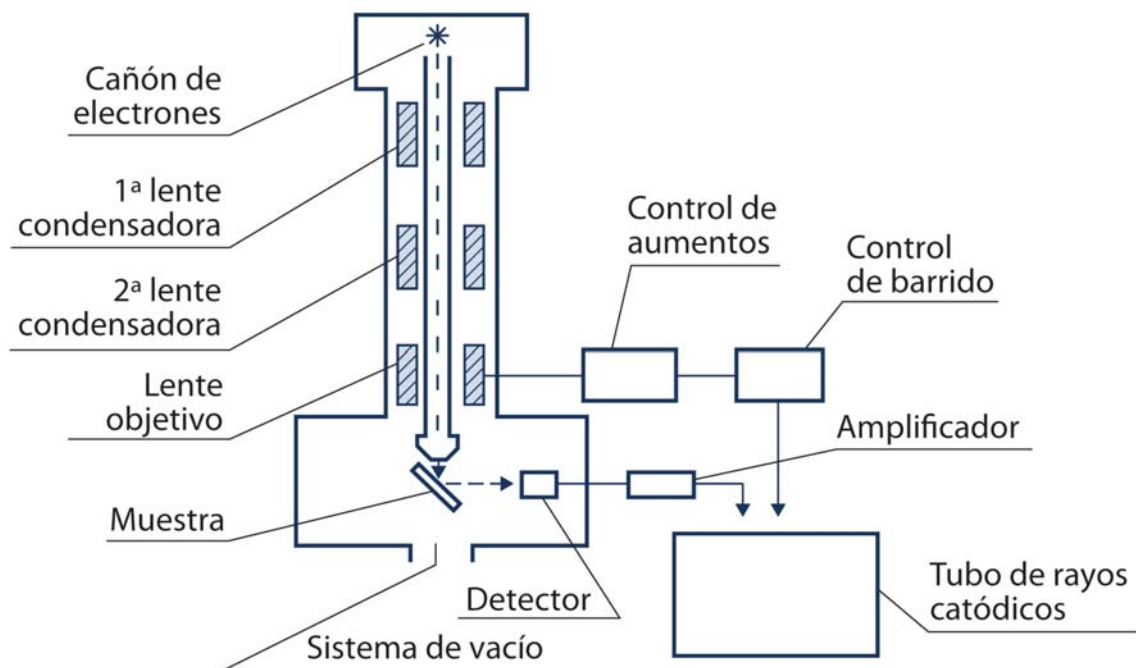


Fig. 1.5. SEM, esquema general de sus componentes (Aballe et al. 1996).

Cuando los electrones pasan a través de la muestra pueden ocurrir diferentes interacciones (Fig. 1.6) que pueden usarse para análisis elemental, análisis cristalográfico, así como la formación de imágenes con diferentes contrastes. Las

interacciones que utiliza el SEM son los electrones secundarios y retrodispersados y se aplican en un patrón de barrido sobre la superficie de la muestra (Aballe et al. 1996).

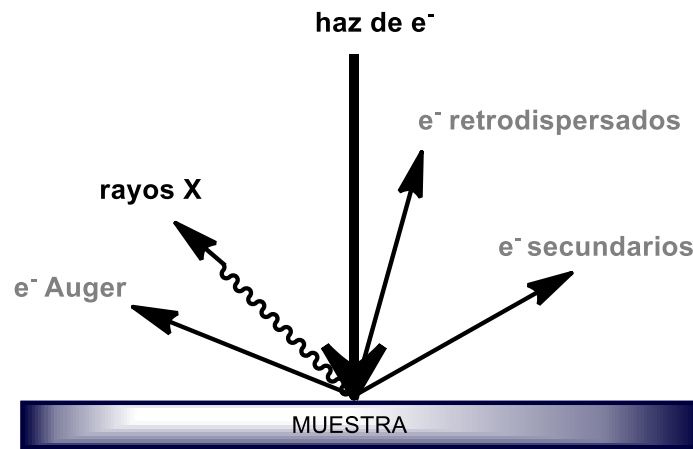


Fig. 1.6. Representación esquemática de las diferentes interacciones que podrían ocurrir cuando un electrón pasa a través de un material. En gris están señaladas las interacciones para el SEM y AES.

1.4.2. Microscopio de rastreo laser confocal (CLSM)

El CLSM se basa en el escaneo de la muestra mediante uno o varios láseres y en el hecho de que tanto la fuente de luz a la salida de la apertura (*pinhole*), como el punto de escaneo en la muestra, como la apertura antes del detector están en planos confocales en el sistema óptico. Esto hace que solo la luz procedente del plano de foco del objetivo llegue al detector y por lo tanto la luz fuera de foco se descarte. Como consecuencia la microscopía confocal representa, respecto a la microscopía de fluorescencia convencional, una mejora en la resolución óptica y permite obtener secciones ópticas de una muestra que, posteriormente, pueden ser procesadas conjuntamente para obtener una reconstrucción tridimensional de la muestra (Nwaneshiudu et al. 2012; Conchello y Lichman 2005).

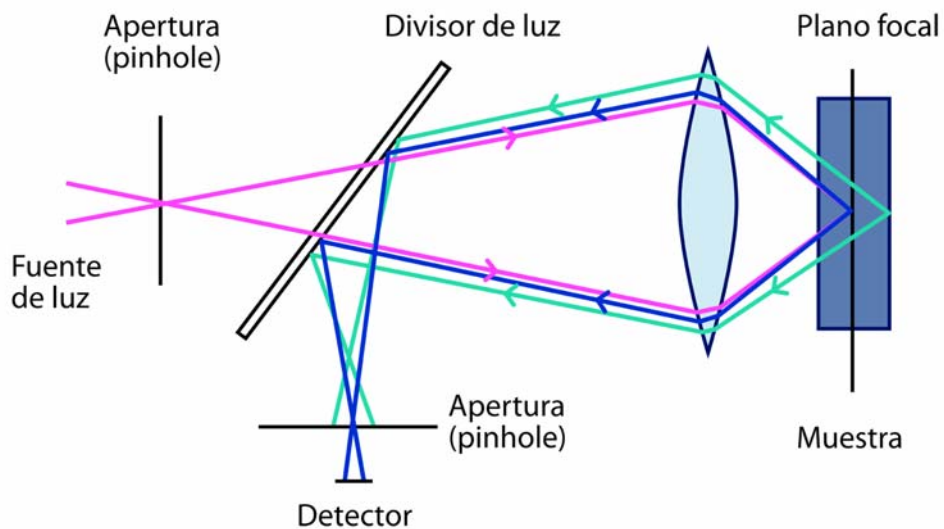


Fig. 1.7. Representación esquemática del principio de la microscopía confocal.

1.4.3. Desventajas del método clásico basado en el microscopio óptico

La evaluación histomorfométrica de la interfase implante-hueso constituye una aproximación invasiva que proporciona datos seguros de la cantidad y calidad del anclaje del implante en el hueso. El gran inconveniente de esta aproximación es que sólo se puede aplicar a nivel experimental. Algunos de los parámetros histomorfométricos usados para estos propósitos *ex-vivo* son: *Bone-to-Implant Contact* (BIC), Densidad de volumen de hueso (BVD, *Bone Volume Density*), y Longitud de implante efectiva (EIL, *Effective Implant Length*). La metodología estándar para la evaluación de estos parámetros es la microscopía óptica. Y de todos ellos, el parámetro más ampliamente determinado es el BIC, definiéndose el BIC% como el porcentaje de la longitud del implante en el que hay contacto directo con el hueso, sin interferencia de tejido fibroso.

A continuación se enumeran algunos de los inconvenientes del procedimiento clásico, basado en el microscopio óptico:

- 1) Necesidad de tinción (fucsina básica, azul de metileno, hematoxilina-eosina).
- 2) Largos procedimientos de laboratorio y procesado de las muestras.
- 3) Baja resolución.
- 4) Riesgo de “sesgo” en la evaluación microscópica.

La determinación del BIC por esta metodología se suele hacer dibujando “manualmente” la línea donde hay contacto hueso-implante ayudándose generalmente de la superposición de una cuadrícula (Parlar et al. 2009). Aunque ciertamente algunos estudios describen un procesado de imagen y análisis digital (Roriz et al. 2010; Vignoletti et al. 2009; Song et al. 2009; Tavares 2007; McMillan et al. 2000), todavía no se ha conseguido una pauta de trabajo definido y el resultado final puede estar influenciado por diferentes parámetros. Este hecho evidencia la necesidad de un método más simple, suficientemente discriminativo, más rápido y que utilice menos recursos para la determinación del BIC. Por consiguiente, es urgente un esfuerzo de investigación en esta área para encontrar un método alternativo al tradicional para llevar a cabo este análisis histomorfométrico.

Algunos estudios han utilizado CLSM para visualizar imágenes de alto contraste de tejidos calcificados sin necesidad de procesar y teñir las muestras (Grötz et al. 1999; Al-Nawas y Götz 2003a; Orsini et al. 2007), tal y como se requiere con el microscopio óptico. También imágenes de CLSM se han usado para analizar el parámetro histomorfométrico BIC en escasos estudios (Al-Nawas et al. 2003b, 2008), adquiriendo la luz reflejada proveniente del implante y el tejido óseo. En este caso, se observa un muy buen contraste entre el hueso y el implante debido a la alta reflexión del implante. Sin embargo pueden producirse falsos positivos por la semejante reflexión del tejido blando y la resina con el tejido óseo.

La técnica SEM se ha utilizado en varias investigaciones para estudiar la textura de la superficie de los implantes (Marin et al. 2008; Ballo et al. 2009; Kelly et al. 2009; Jeong et al. 2010; Fontana et al. 2011; Johansson et al. 2011; Coelho et al. 2012). Recientemente, se han usado datos de análisis elemental obtenidos con SEM para evaluar la composición de hueso neoformado en diferentes sistemas de implantes. (Ballo et al. 2009; Calvo-Guirado et al. 2012). Sin embargo, según nuestros datos, la determinación del BIC basada en imágenes de SEM se ha llevado a cabo en muy pocos casos hasta el momento (Chang et al. 2009; Lee et al. 2009; Vidigal et al. 2009).

1.5. Intentos de correlacionar valores de ISQ y parámetros histomorfométricos

Una serie de experimentos y estudios clínicos han puesto de manifiesto que los valores de AFR aumentan durante el periodo de cicatrización después de la colocación del implante. La FR (frecuencia de resonancia) varía paralelamente a la rigidez del sistema transductor-implante excitado. Así, cambios en la FR del implante podrían indicar cambios en el anclaje del implante (Meredith et al. 1997a, 1997b; Sennerby et al. 2005), y por consiguiente podrían ser útiles para documentar la estabilidad clínica de los implantes (Meredith et al. 1996; Meredith 1998a; Zix et al. 2008). En los últimos quince años, se han publicado varios estudios (Meredith et al. 1997b; Nkenke et al. 2003; Gedrange et al. 2005; Schliephake et al. 2006; Scarano et al. 2006; Huwiler et al. 2007; Zhou et al. 2008; Ito et al. 2008; Abrahamsson et al. 2009; Stadlinger et al. 2009, 2012; Jun et al. 2010; Blanco et al. 2011; Abdel-Haq et al. 2011) tratando de establecer la validez del AFR en la evaluación del anclaje implante-hueso mediante la correlación de valores ISQ y parámetros histomorfométricos.

La comparación de los trabajos realizados en este ámbito es difícil, debido a la heterogeneidad de los estudios y la naturaleza de los test utilizados en a) diferentes tipos de análisis histomorfométricos: BIC (total, bucal o lingual), BVD (*Bone Volume Density*), EIL (*Effective Implant Length*), etc.; b) experimentos *in vivo* vs. *in vitro*; c) estudios en animales vs. estudios en humanos; d) cadáveres vs. pacientes; e) diferentes modelos animales – conejos, perros, “mini-pigs”, ovejas, etc.– en mandíbula, tibia, fémur, etc.; y f) variaciones en el diseño macro y microscópico de los implantes. En consecuencia, todavía no existen datos concluyentes sobre la relación entre la interfase hueso-implante y los valores de AFR.

Es importante mencionar que, de entre todos los estudios disponibles, siempre las mediciones histomorfométricas (BIC%) se llevaron a cabo mediante el procedimiento convencional, analizando las muestras teñidas al microscopio óptico. En relación al instrumento utilizado para medir la FR, la medición de los valores ISQ se llevó a cabo mayoritariamente con el aparato electrónico Osstell®. Solo cuatro estudios ofrecen datos de la versión más precisa, Osstell Mentor®.

Capítulo 2. OBJETIVOS

2. Objetivos de la Tesis Doctoral

En base a todo lo expuesto, en el presente estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

2.1. Objetivos primarios

- Probar la hipótesis de trabajo que las mediciones de la estabilidad del implante AFR (Osstell Mentor®) se correlacionan con datos histomorfométricos de contacto hueso-implante (BIC%) en un experimento en perro Beagle.
- Establecer un procedimiento de análisis de imágenes para medir el contacto hueso-implante (BIC) mediante una aproximación no subjetiva y sistemática basada en imágenes de microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersados (BS-SEM).

2.2. Objetivos secundarios

- Clarificar la actual controvertida relación entre el AFR y los parámetros histomorfométricos mediante una revisión de la bibliografía publicada en esta área en las últimas dos décadas.
- Establecer las ventajas e inconvenientes del nuevo procedimiento de análisis de BIC% basado en imágenes BS-SEM, respecto al método tradicional y a otros métodos.

La **Memoria** de esta Tesis Doctoral se presenta según la modalidad por artículos. Una parte sustancial de los resultados que se informan ya han sido publicados y copias de los artículos se adjuntan en el **capítulo 7**.

En el **capítulo 3** se recogen los materiales utilizados y los métodos puestos a punto para la determinación del BIC mediante imágenes BS-SEM y la evaluación de los valores ISQ mediante el aparato magnético Ostell Mentor®. En este apartado además, se describe el diseño del experimento y el análisis estadístico de la correlación entre los valores ISQ y el BIC. Resultados publicados (2013) *on line (in press)* en dos artículos de la revista *Clinical Oral Implant Research* (dois: 10.1111/clr.12129 y 10.1111/clr.12256).

En el **capítulo 4** se detallan los resultados y la discusión relativa a la determinación del BIC mediante imágenes BS-SEM. Material publicado en *Clinical Oral Implant Research* (doi: 10.1111/clr.12129).

En el **capítulo 5** se detallan los resultados y la discusión relativa a la obtención de los valores ISQ (determinados por RFA) mediante el Ostell Mentor® y su correlación con el BIC%. También se incluye en este apartado un análisis comparativo de los resultados de correlación obtenidos en este estudio y otras investigaciones en el área realizadas en los últimos quince años. Material publicado en *Clinical Oral Implant Research* (doi: 10.1111/clr.12256).

En el **capítulo 6** se incluyen las conclusiones de los resultados obtenidos en la investigación llevada a cabo.

En el **capítulo 7** se adjuntan los artículos en que se han publicado los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral.

Capítulo 3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Implantes (*Artículos I y II*)

Se colocaron y evaluaron 36 implantes, todos ellos de 9 mm de longitud y 4 mm de diámetro con una superficie SBM (*Soluble Blasting Media*, arenado con partículas solubles) suministrados por la Compañía Biohorizons® Implant Systems INC. (Birmingham, AL 35243, USA).

3.2. Animales de experimentación (*Artículos I y II*)

Seis perros Beagle adultos, con un peso promedio de 11,5 Kg, se seleccionaron y se trasladaron a las instalaciones del estabulario del *Campus* de Ciencias de la Salud de Bellvitge (UB) bajo supervisión veterinaria. De acuerdo con las directrices ARRIVE (*Animals in Research: Reporting in vivo Experiments*) para la presentación de informes en animales de experimentación (Kilkenny et al. 2010, Berglundh y Stavropoulos 2012), el presente estudio fue aprobado por la Comisión Ética de Experimentación en Animales (CEEA) de la Universidad de Barcelona (UB). Para llevar a cabo este estudio, el número de animales se redujo al mínimo de acuerdo con el principio de las 3Rs (*Replacement, Refinement and Reduction of animals in research*) tal como lo definió Kilkenny et al. en 2010. El diseño del estudio se muestra en la Fig. 2.1. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las directrices del Gobierno Español (Real Decreto 1201/2005 del 10 de Octubre, Boletín del Estado Español 252, 21 de Octubre, 2005) y Europeas (European Union Council Directive of November 24th, 1986, 86/609/EEC) para el uso y cuidado de animales. A lo largo de todo el estudio experimental, los animales se alimentaron con dieta blanda y se llevó a cabo el cepillado de los dientes e implantes diariamente.

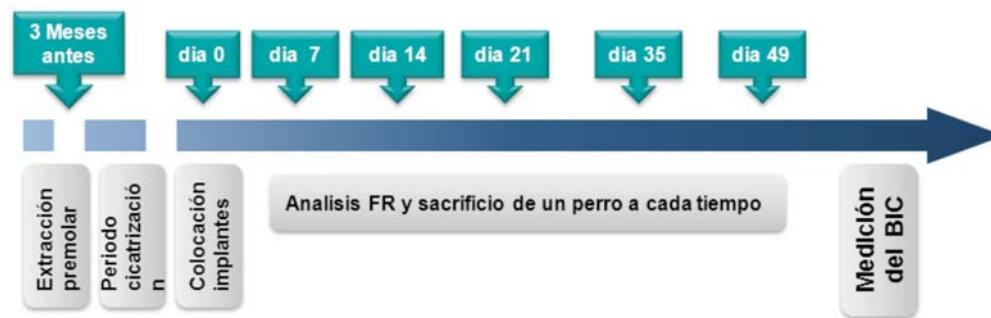


Fig. 3.1. Diseño y temporalización de las diferentes fases del estudio.

3.3. Procedimiento quirúrgico (*Artículos I y II*)

En cada una de las fases quirúrgicas se utilizó el mismo protocolo de anestesia, analgesia y antibioticoterapia. Los perros se premedicaron vía subcutánea, tras un ayuno de 12 horas, con: 1) atropina 0,05 mg/Kg, 2) meloxicam (Metacam[®]) 0,4 mL/10 Kg y 3) maleato de acepromacina (Calmo Neosan[®]) 0,5 mL/10 kg. Tras una espera aproximada de 15 minutos se realizó la inducción de la anestesia general con barbitúricos (tipoental sódico 20 mg/Kg) por la vena cefálica del perro. A continuación se intubaron los animales con una sonda endotraqueal y se mantuvo la anestesia con gases (oxígeno y óxido nitroso) y con isoflurano al 2-2,2%. La analgesia intraoperatoria se realizó con buprenorfina a dosis de 0,03 mg/kg vía intravenosa. Se suministró *Ringer lactato* por vía parenteral durante todo el procedimiento quirúrgico. Durante los 5 días posteriores a la cirugía, se realizó un tratamiento antiinflamatorio con meloxicam (Metamecam[®], Rhein, Alemania), un AINE de efecto 24 horas (0,4 mL/10 Kg/24 h). El tratamiento antibiótico se inició el día anterior a la cirugía y se mantuvo durante una semana tras la cirugía, administrándose vía subcutánea amoxicilina (Clamoxyl[®] LA) (1 mL/10 Kg/48 h).

Se extrajeron bilateralmente el primer, segundo, tercer y cuarto premolar de la mandíbula. Para ello se realizó la odontosección del segundo, tercer y cuarto premolar con una fresa Komet[®] (Rock Hill, USA) acoplada a un mandril convertidor A.C.A Proclinic[®] (Barcelona, España) y una pieza de mano PM 1:1 Bien Air[®] (Bienne, Suiza). Las raíces de los 4 premolares se luxaron y extrajeron con un fórceps de incisivos inferiores para humanos Carl Matan[®] (Solingen, Alemania). Después de un periodo de cicatrización de 3 meses, se colocaron un total de 36 implantes (9 mm de longitud, Ø 4,0 mm; Biohorizons[®] Implant Systems INC. Birmingham, AL 35243,

USA) con una superficie SBM. En cada región hemimandibular premolar se colocaron 3 implantes a 7 mm de distancia uno de otro. Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo por el propio doctorando (C. M.). Se inició el procedimiento con la infiltración de anestesia local (articaína 4%; VC 1:100.000) y la elevación de un colgajo de espesor total bucal y lingual de la zona premolar de ambas hemimandíbulas. El procedimiento de colocación de los implantes se llevó a cabo siguiendo las instrucciones y protocolo de fresado del fabricante (Biohorizons[®], USA) para asegurar un procedimiento quirúrgico estandarizado. Para la instalación de todos los implantes el torque de inserción se estableció en 40 Ncm. Los colgajos se suturaron con puntos simples con seda de 4-0 y aguja de sección triangular (Laboratorios Aragón[®], Barcelona, España). Las suturas se retiraron después de 10 días.

Finalmente, los perros se sacrificaron en los tiempos 0, 1, 2, 4, 6 y 8 semanas, respecto al momento de la colocación de los implantes, mediante una sobredosis de tiopental sódico. A continuación se diseccionaron las hemimandíbulas y se dividieron en tres fragmentos, usando una sierra de diamante oscilatoria. Cada bloque se introdujo en un frasco numerado con una solución al 10% de formol tamponado.

3.4. Mediciones de Frecuencia de Resonancia (FR): Osstell Mentor[®] (Artículo II)

Inmediatamente después de la instalación de los implantes, se llevó a cabo la evaluación de los valores ISQ mediante Osstell Mentor[®] siguiendo las instrucciones del fabricante (Integration Diagnostics, Gothenburg, Suecia). Con la ayuda del transportador manual el SmartPeg[®] tipo 1 se fijó atornillándose a la cabeza del implante, cada vez. Para las mediciones de la FR, la sonda del Osstell Mentor[®] (Fig. 3.2) se aproximaba a la distancia recomendada por el fabricante, sin estar nunca en contacto, y se estimulaba el SmartPeg[®] magnéticamente. En todos los casos, las mediciones se tomaron dos veces, siempre posicionando la sonda perpendicular a la cresta mandibular. Osstell Mentor[®] transforma automáticamente los valores de FR (en Hertz) en unidades ISQ. El rango de valores posible va de 1 a 100, siendo 100 el grado más alto de estabilidad. La estabilidad después de la instalación de los implantes se estudió también en los tiempos 1, 2, 4, 6 y 8 semanas.

Los perros se sacrificaron en los tiempos 0, 1, 2, 4, 6 y 8 semanas después de la instalación de los implantes y tras la obtención secuencial de las mediciones

FR en cada tiempo. Tras cada uno de los sacrificios, se procedió a la preparación de las muestras para su análisis histológico.



Fig. 3.2. Determinación de los valores ISQ. En la imagen, medición tomada en sentido vestibulo- lingual.

3.5. Preparación de las muestras (*Artículos I y II*)

Las biopsias se procesaron según el método de preparación más comúnmente usado hasta la fecha para el análisis morfológico de las interacciones hueso-implante (Donath y Breuner 1982; Donath 1985). Las muestras implante-hueso se fijaron en formaldehído al 10% durante una semana y se deshidrataron en una serie de disoluciones de alcohol (en concentración ascendente) antes de ser incorporadas sin descalcificación en resina epoxi fotopolimerizable (Technovit[®], Exakt-Kultzer, Wahrheim, Alemania). Los bloques se seccionaron por la mitad del eje longitudinal buco-lingual de los implantes con una sierra oscilante con hoja de diamante (Exakt micro-parallel-grinding System[®], Exakt, Nordenstedt, Alemania) y luego fueron rectificadas y alisadas con papel de lija de grano 1200 y 4000 para obtener una superficie pulida (Fig. 3.3). De cada implante se preparó una sección para su observación al microscopio electrónico de barrido. Los bloques se cubrieron con carbono evaporado y se fijaron con plata coloidal. Se dirigieron cuatro pistas de plata a la región de interés con el fin de mejorar la conductividad de la muestra (Franch et al. 2000).

3.6. Adquisición de las imágenes mediante Microscopía electrónica de barrido usando electrones retrodispersados (BS-SEM) (*Artículo I*)

Tanto la adquisición de las muestras como su posterior procesado y análisis se realizaron en los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).



Fig. 3.3. Procesado de las muestras: a) Deshidratación, b) Inclusión en resina, c) Sección en el eje longitudinal medial del implante, d) Pulido.

Antes del recubrimiento de las muestras con carbono, se observaron y fotografiaron con un lupa binocular Leica MZFLIII para asegurar la calidad de los bloques seccionados y facilitar su identificación posterior. Las imágenes se adquirieron mediante una cámara Canon Power-Shot A610 acoplada a un estereoscopio (Fig. 3.4a). Después del recubrimiento de carbono, las muestras se analizaron por BS-SEM (S 360, Leica, Cambridge, UK). Todas las muestras se observaron en las mismas condiciones (20 mm WD, magnificación 50x, 1 nA y 20 kV), y se obtuvieron fotos consecutivas (de 10 a 16 imágenes por muestra) con al menos un 15% of superposición a lo largo del contorno del implante.

3.7. Procesado de las imágenes y determinación del BIC % (Artículo I)

El procesado de imágenes y análisis se llevó a cabo usando el paquete de procesado de imágenes Fiji (<http://pacific.mpi-cbg.de/>). Las imágenes se unieron unas a otras con el *plugin* de *stitching* de Fiji (Preibisch et al. 2009) para tener una composición de toda la sección (Fig. 3.4b). Este *plugin* permitió el pegado automático de todas las imágenes en un directorio, pero también permite una aproximación de pegado manual 2D cuando la primera opción no funciona adecuadamente.

El primer paso en el análisis de imágenes fue segmentar el implante. Para llevarlo a cabo, la imagen completa (pegada) se filtró primero con un filtro mediano de radio 2 y se estableció un umbral para los niveles de grises máximos (200–255). Esto resultó en la imagen binaria del implante (Fig. 3.4c). El segundo paso fue forzar

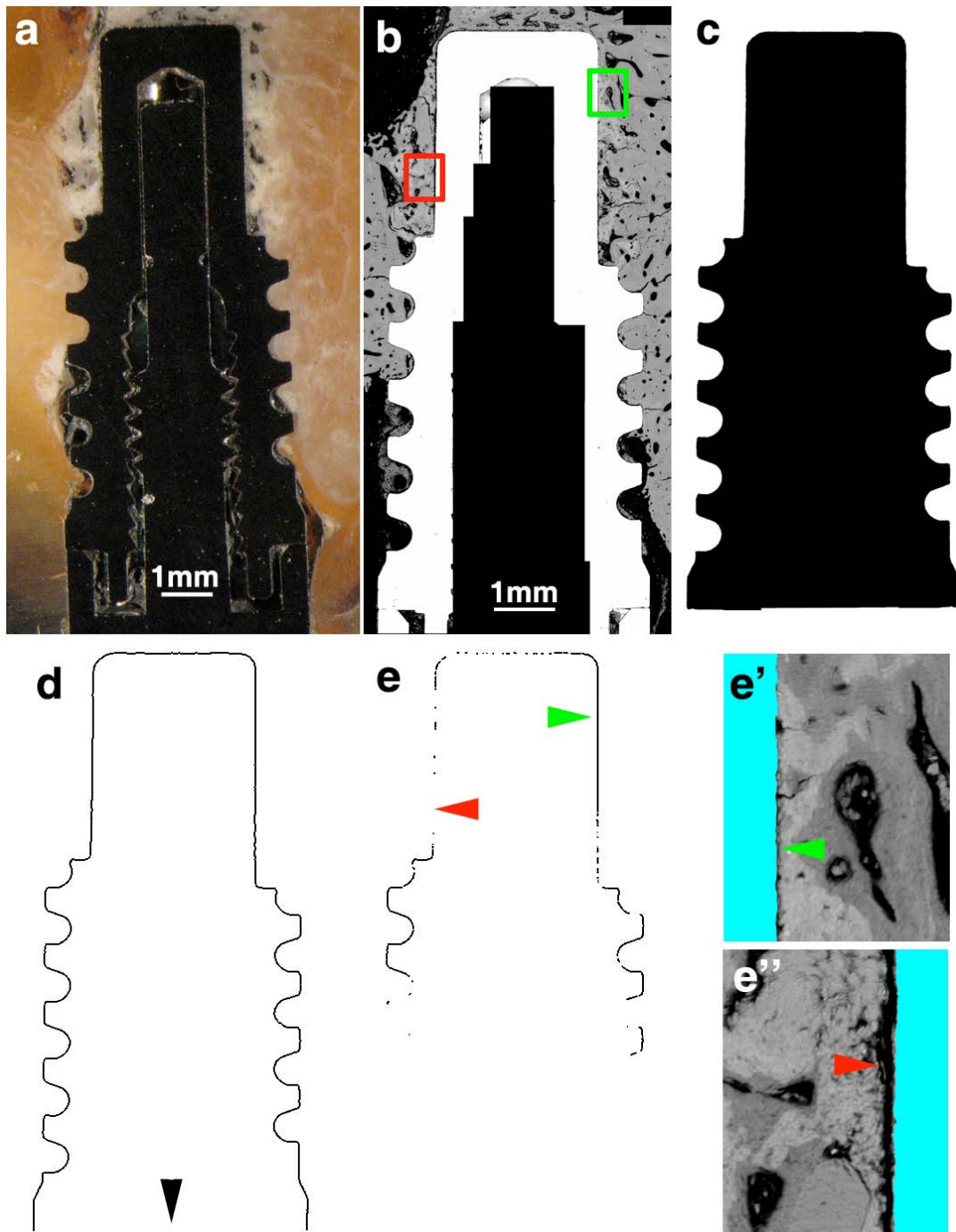


Fig. 3.4. Determinación del contacto hueso-implante (BIC) basada en imágenes de microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersados (BS-SEM). (a) Imagen estereoscópica de una muestra. (b) Imagen de un implante completo conformada a partir de 14 imágenes BS-SEM. Obsérvese la diferencia en intensidad entre el implante (blanco) y el tejido óseo (gris). (c) Imagen binaria del implante segmentado. (d) Perfil del implante después de dilatarlo. Se retira la línea del borde externo (punta de flecha negra). (e) Línea de intersección entre (d) y (b). (e' y e'') Inserciones de áreas verde (e') y roja (e''). El implante se colorea en azul. Puntas de flecha en verde y rojo en (e-e'') señalan una región con y sin BIC, respectivamente. Escala barra: 1 mm.

una región de solapamiento entre el implante y el hueso y para ello se dilató la imagen binaria seis veces; se añadieron seis píxeles a los bordes del implante, lo equivalente a 15 μm en todo su perímetro. Esta distancia se ajustó para superar la distancia mínima observada entre el hueso y el implante (Fig. 3.4e') ocasionada, probablemente, por la tensión aplicada sobre los polímeros incrustados en el bloque y/o por la cámara de vacío del BS-SEM. Las distancias más allá de lo establecido, se consideraron como ausencia de BIC (Fig. 3.4e''). Finalmente el implante ampliado se perfiló para generar una línea de un píxel de ancho alrededor de él (Fig. 3.4d), que se usó para establecer la intersección del hueso en la imagen original. El solapamiento entre el hueso y el contorno se obtuvo (Fig. 3.4e) usando la operación booleana *min* de la función calculadora entre imágenes de Fiji. Esta operación dio una imagen de una línea de un píxel de ancho donde el contorno del implante interseccionaba el hueso y donde el nivel de gris era la mínima intensidad entre ambos. Por consiguiente, los niveles de grises de la línea de solapamiento corresponden al tejido óseo. Este método también permitiría, si se quisiera, diferenciar y analizar entre las diferentes calidades óseas (gradientes de gris).

Finalmente, se calculó el porcentaje de BIC a lo largo de la longitud total del implante (bucal y lingual). La longitud del perfil del implante total se consideró como el máximo posible BIC (100%) y la longitud del solapamiento se consideró como el BIC real. Ambas mediciones se llevaron a cabo después de la substracción de la parte correspondiente a la cabeza del implante (Fig. 3.4d), donde el BIC no es posible. El porcentaje del BIC se calculó dividiendo el BIC real por el BIC máximo posible y multiplicando por 100.

3.8. Análisis estadístico (Artículo II)

Los datos obtenidos en el análisis histológico de cada sección y los valores obtenidos del AFR de cada implante se unieron para cada tiempo de curación y se calcularon sus valores promedio, medianas y percentiles 25 y 75.

El grado de osteointegración (en BIC%) se comparó con los valores de ISQ para las muestras del implante correspondiente usando el coeficiente de correlación de Spearman (Myers y Well 2003). En el análisis de la correlación, se usó el implante como unidad estadística (N = 36) (Koch y Paquette 1997). La hipótesis nula fue rechazada a $P < 0,05$. El análisis estadístico se llevó a cabo con el SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Capítulo 4. RESULTADOS

4.1. Cicatrización y estabilidad de los implantes

Se consiguió una buena estabilidad primaria de todos los implantes en el momento de su instalación. Durante el periodo de cicatrización, ninguno de los 36 implantes mostró movilidad clínica.

4.2. Artículo I

4.2.1. Microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersados (BS-SEM)

La obtención de imágenes por BS-SEM es una técnica útil para evaluar diferencias en densidad de superficie de tejidos calcificados, proporcionando imágenes con diferentes niveles de grises (Franch et al. 2000; Roschger et al. 2003). Cuanto mayor es la densidad de una estructura atómica específica de un mineral, mayor es el número de electrones retrodispersados desde la superficie y más brillante es la imagen resultante (Goldstein et al. 2005). Así, los tejidos calcificados muestran diferentes niveles de grises en las imágenes dependiendo de su concentración en calcio, mientras que el material incrustado y el tejido no-calcificado aparecen en negro (Fig. 4.1). El implante metálico, por otra parte, aparece casi saturado en el máximo de la escala de grises, debido a la alta densidad de la aleación de titanio. El método para evaluar el BIC descrito en este estudio está basado en el gran contraste entre hueso e implante de las imágenes BS-SEM.

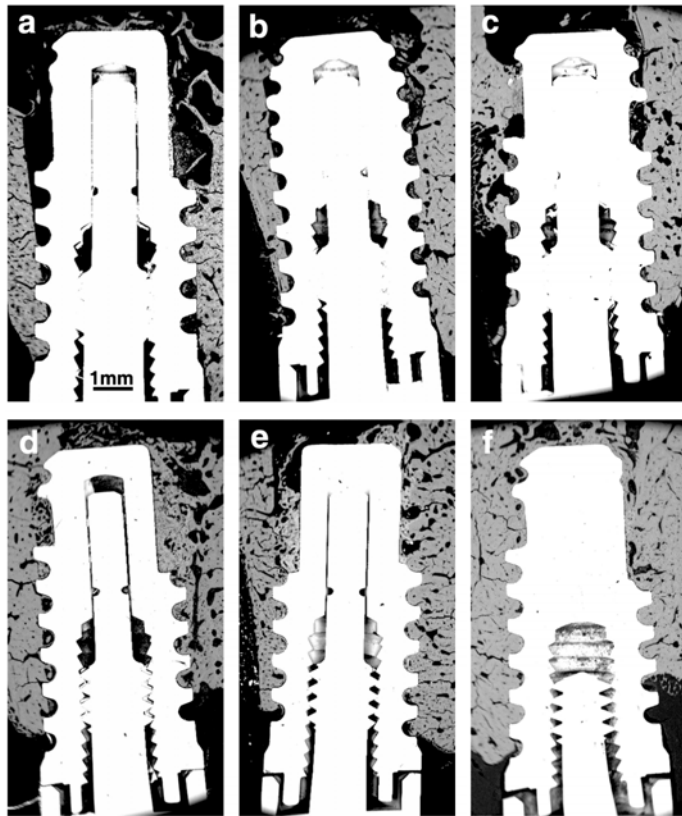


Fig. 4.1. Progresión del contacto hueso-implante. a-f) imágenes BS-SEM de diferentes implantes a 0, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 semanas, respectivamente. Obsérvese el incremento del BIC a lo largo del tiempo. Todas las imágenes están a la misma escala.

4.2.2. Determinación de BIC mediante imágenes BS-SEM

El resultado obtenido con esta metodología de adquisición, procesado y análisis de las imágenes se muestra en la Tabla 4.1 y la Fig. 4.2. Considerando los valores medios para cada tiempo, el contacto hueso-implante (BIC%) subió a 24,70% inmediatamente después de la instalación del implante. Después de una semana de cicatrización, el BIC% descendió a 23,70 y luego a 22,90% en la semana 2. Desde la semana 2 a la semana 6 el BIC% se incrementó gradualmente, siendo 36,20 y 33,0%, respectivamente, en las semanas 4 y 6. Finalmente, en la semana 8, el valor de BIC% se estableció en un 45,50%. Las Figuras 4.1 y 4.3 muestran la progresión del contacto hueso-implante a lo largo del tiempo. En la Fig. 4.3 sólo está representada una espira del implante por cada tiempo, aunque las mediciones del BIC se llevaron a cabo en toda la longitud del implante. Las imágenes correspondientes a los periodos iniciales, de las semanas 0 a 2, mostraron que el tejido calcificado alrededor del implante era inmaduro y estaba rodeado de espacios vasculares (Fig. 4.3a-c). Las imágenes en la cuarta semana mostraron un alto nivel de contacto entre el implante y una estructura ósea más densa con pocos y

pequeños espacios vasculares y tejido óseo más maduro (Fig. 4.3d). En las semanas 6 y 8 el incremento en las mediciones del BIC% evolucionó en paralelo con el incremento en madurez del tejido óseo que gradualmente rodeó la superficie del implante (Fig. 4.3e-f).

Tabla 4.1. Porcentaje de contacto hueso-implante (BIC%)

BIC % (BS-SEM)					
Tiempo (semanas)	Medias	DE	Q25	Medianas	Q75
0	24,69	11,64	19,52	22,31	33,80
1	23,66	4,78	19,66	23,37	27,15
2	22,85	7,43	21,60	25,84	27,61
4	36,16	11,54	26,27	34,18	46,81
6	32,97	16,52	21,02	29,99	40,91
8	45,51	17,16	38,11	44,29	58,28

DE, desviación estándar; BS-SEM, *Backscattered Scanning Electron Microscopy*; Q25, cuartil 1 (25%); Q75, cuartil 3 (75%)

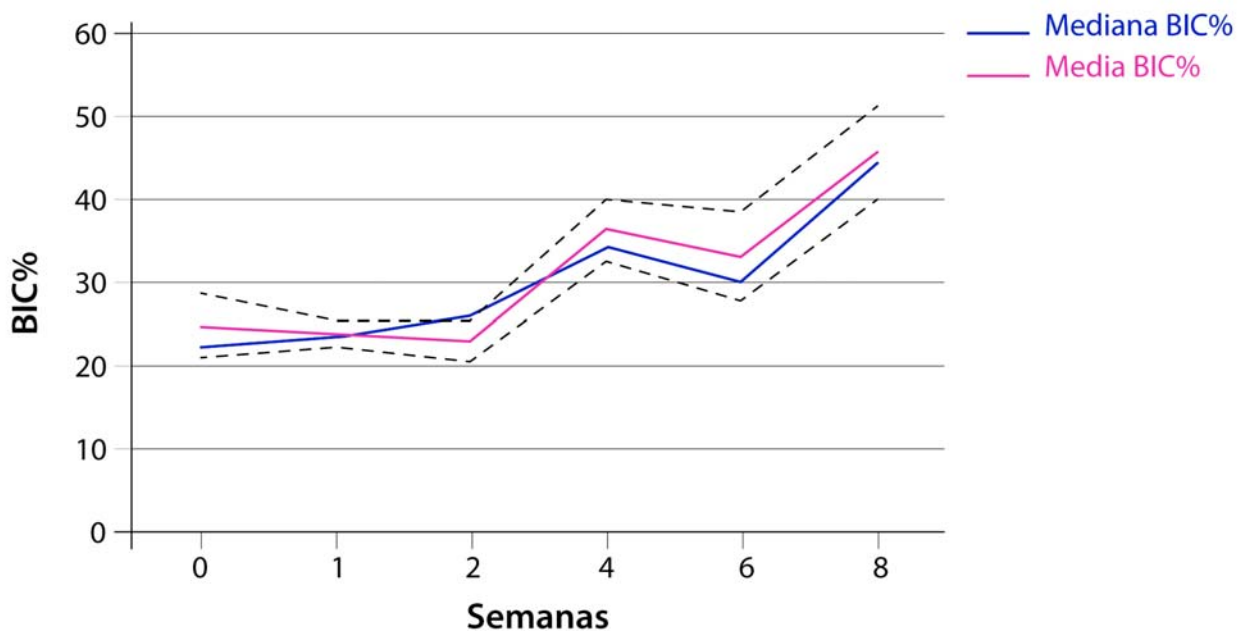


Fig. 4.2. Valores de medias y medianas del BIC% en el periodo de mediciones de ocho semanas del seguimiento. Cada valor corresponde a las seis unidades de implante del mismo tiempo. Las líneas discontinuas corresponden al intervalo de confianza del 95%.

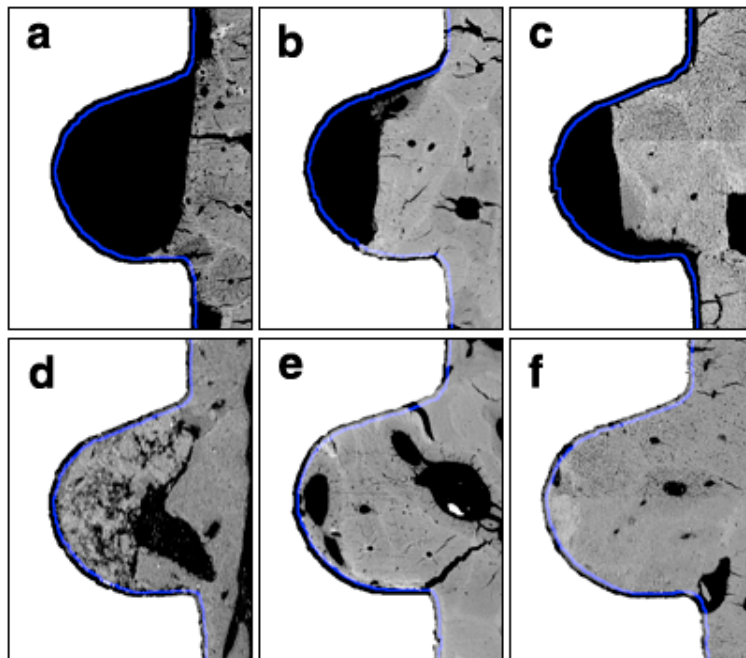


Fig. 4.3. Progresión del contacto hueso-implante. Detalle de las seis espiras a las 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 6 (e) y 8 (f) semanas, respectivamente. Los implantes se muestran en blanco, el hueso en gris y la línea donde se mide el BIC en color azul. El grosor de la línea se ha ampliado con fines de representación. Obsérvese como la línea azul incrementa el solapamiento con el hueso a lo largo del tiempo debido al incremento de hueso que entra en contacto con el implante. Todas las imágenes están a la misma escala.

4.3. Artículo II

4.3.1. Determinación de los valores de ISQ mediante AFR

En el momento de la instalación del implante, el valor medio ISQ (Tabla 4.2 y Fig. 4.4) fue de 80,91. Del día 0 a la semana 1 se observó un pequeño descenso en los valores de RFA (79,75). El valor ISQ se incrementó de la semana 1 a la semana 2 (81,17). De la semana 2 a la semana 4 los valores de RFA permanecieron estables (81,58) y luego subieron hasta 83,75 en la semana 6. Finalmente, después de 8 semanas, se observó un pequeño descenso en los datos, siendo el valor medio ISQ de 81,08, muy parecido al valor inicial.

Tabla 4.2. Valores ISQ para todas las mediciones de FR

Valores ISQ - Osstell Mentor®					
Tiempo (semanas)	Medias	DE	Q25	Medianas	Q75
0	80,91	3,26	80,25	81,50	83,13
1	79,75	4,92	75,62	79,75	84,25
2	81,17	3,37	81,00	81,50	82,75
4	81,58	5,96	83,13	83,75	84,38
6	83,75	2,19	82,88	84,50	85,00
8	81,08	2,94	80,25	81,50	82,75

DE, desviación estándar; Q25, cuartil 1 (25%); Q75, cuartil 3 (75%)

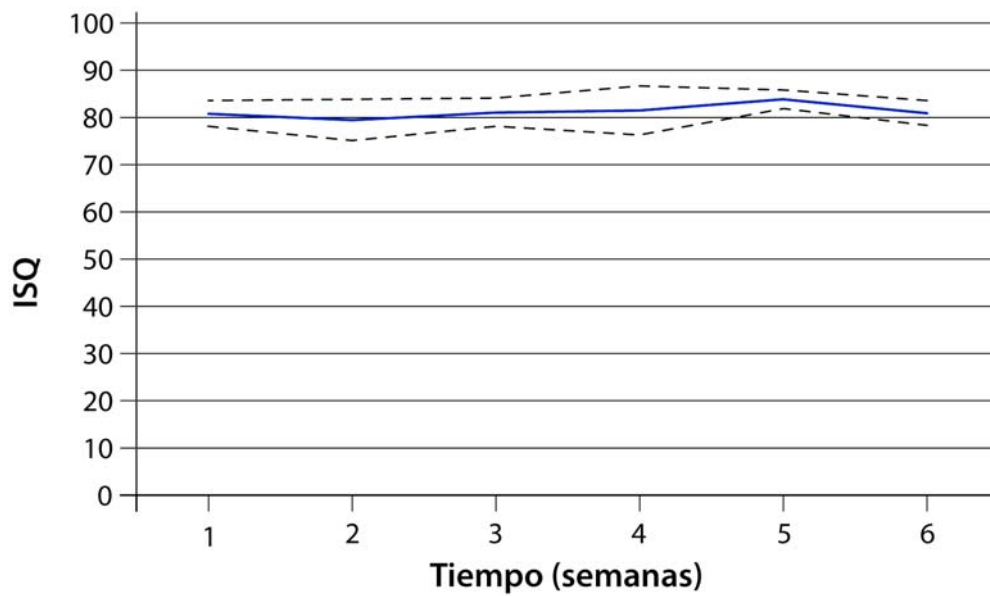


Fig. 4.4. Diagrama de los valores ISQ obtenidos con el aparato Osstell Mentor[®] desde el día 0 hasta la semana 8. La DE (Desviación Estándar) se muestra en líneas discontinuas.

4.3.2. Correlación entre los valores de ISQ y BIC%

Las diferencias en el BIC% no se reflejaron en el AFR durante las ocho semanas del periodo de monitorización. No se halló correlación estadísticamente significativa entre los valores de AFR y BIC. Coeficiente de correlación de Spearman = -0,083 (Fig. 4.5).

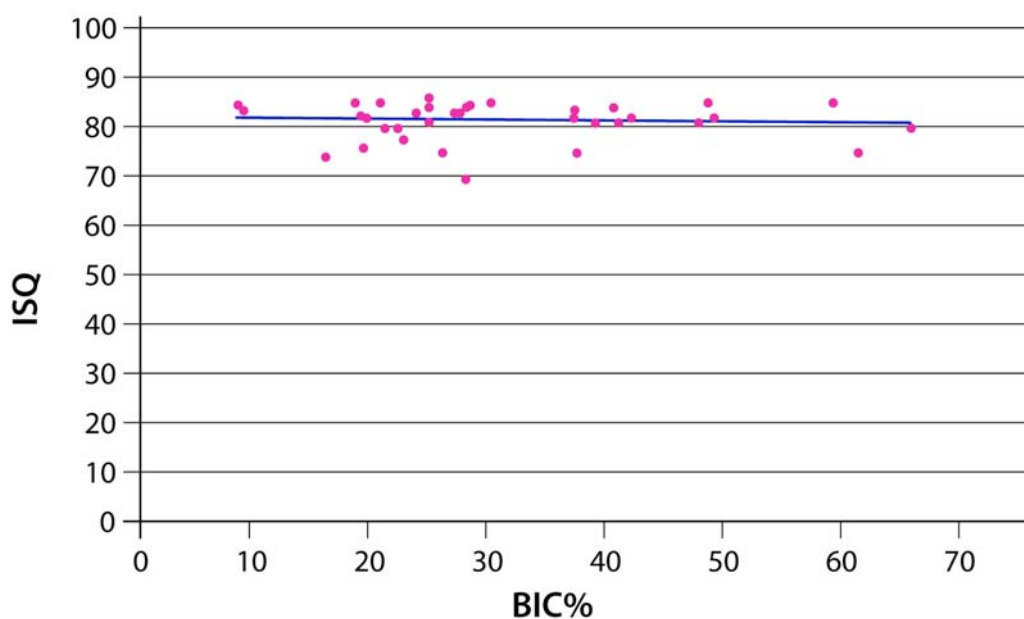


Fig. 4.5. Correlación entre los valores de ISQ y BIC%.

Capítulo 5. DISCUSIÓN

5.1. Ventajas del método propuesto de obtención del BIC en relación a los métodos previamente descritos

El nuevo método para la determinación del BIC basado en imágenes BS-SEM, descrito en esta memoria ofrece varias y significativas ventajas sobre las técnicas clásicas basadas en los procesos de serrado-pulido (Donath y Breuner 1982) y la evaluación de las secciones finas teñidas mediante el microscopio óptico (Abrahamsson et al. 2009; Calvo-Guirado et al. 2011; Santis et al. 2011). A continuación se enumeran estas ventajas:

- 1) Evita el riesgo de sesgo ya que no necesita tinción y el proceso de análisis de imágenes es estandarizado.
- 2) La medición del BIC es más precisa ya que las imágenes BS-SEM tienen una mayor resolución y un mayor contraste entre el implante y el hueso que las imágenes del microscopio óptico convencional.
- 3) El método permite el análisis de todo el implante en vez de áreas individuales, proporcionando así una medida de BIC más completa. Sin embargo si interesara medir el BIC en un área específica, el método de análisis de imágenes propuesto es absolutamente adaptable, preciso y robusto.
- 4) El microscopio BS-SEM es capaz de diferenciar tejido calcificado dependiendo de la concentración de calcio. La línea donde se midió el BIC real podría ser analizada en base a los niveles de intensidad, que dependen de la concentración de calcio detectada en la imagen. Además, las

características morfológicas de los tejidos calcificados, tales como el tamaño y la forma de las lagunas óseas y las líneas de cementación también podrían ser evaluadas y sometidos a un análisis cuantitativo (López-López et al. 2009).

- 5) El procesado de imágenes mediante BS-SEM es no-destrutivo y por consiguiente permite adicionalmente una observación histológica posterior de las muestras.
- 6) En comparación con el método clásico, el tiempo de procesado y análisis de las muestras se reduce.
- 7) El método de análisis podría también usarse para medir el BIC sobre imágenes provenientes del microscopio óptico convencional y el CLSM.

5.2. Intentos previos en la correlación de parámetros histomorfométricos y valores de FR

El AFR se considera una herramienta clínica potencialmente útil para el diagnóstico, predicción y prevención del fracaso de los implantes y es ventajoso en la monitorización de los implantes viables (Meredith 1998a; Huang et al. 2002; Glauser et al. 2004; Sjöström et al. 2005; Zix et al. 2008). Sin embargo la validez de esta relativamente nueva técnica todavía está por determinar mediante la correlación de los resultados obtenidos con ella y otros métodos que evalúen la capacidad de soporte y/o fijación de un implante, tales como test mecánicos, exámenes radiológicos y, finalmente, análisis isométricos.

Las evaluaciones histológicas e histomorfométricas son los métodos más precisos para observar los cambios morfológicos en la interfase implante-hueso. Se ha sugerido que el AFR está relacionado con la rigidez del implante en los tejidos circundantes (Meredith et al. 1996, 1997a, 1997b). La rigidez de la unidad implante-hueso que se supone es evaluada por el AFR, puede verse afectada por el espesor de la capa de hueso en la superficie del implante y la densidad del hueso alrededor del implante. Por consiguiente, un aumento de contacto hueso-implante se supone que debe dar lugar a una mayor rigidez de la estructura e incrementaría la fuerza interfacial (Sennerby et al. 2005; Gedrange et al. 2005). Se han publicado diferentes resultados sobre una posible relación entre el AFR y el BIC. La literatura disponible en esta área es controvertida y se recoge en la Tabla 5.1. A continuación se

describen estudios sobre correlaciones positivas y negativas entre el AFR y parámetros histomorfométricos, tanto en estudios clínicos como en experimentales.

Tabla 5.1. Revisión bibliográfica sobre la correlación entre ISQ y BIC

Autores	Experimento	Aparato AFR	Correlación ISQ-BIC	Correlación de RFA con otros parámetros
Meredith et al. 1997b	conejos (tibia)	Osstell®	No	Si: EIL ^a
Nkenke et al. 2003	cadáver	Osstell®	Si (lado bucal)	No: ITV ^b No: Densidad ósea
Gedrange et al. 2005	cadáver	Osstell®	Si	No: Densidad ósea (evaluación radiográfica)
Sliephake et al. 2006	perros (mandíbula)	Osstell®	No	No: ITV ^b No: BVD ^c
Scarano et al. 2006	estudio clínico	Osstell®	Si	
Huwiler et al. 2007	estudio clínico	Osstell®	nd ^d	No: BVD ^c No: BTC ^e
Zhou et al. 2008	conejos	Osstell®	Si	No: Gammagrafía ósea
Ito et al. 2007	mini-pigs (tibia)	Osstell®	No	
Abrahamsson et al. 2009	perros (mandíbula)	Osstell®	No	No: Densidad ósea No: EIL ^a
Jun et al. 2010	cadáver	Osstell® Osstell Mentor®	No	No: ITV ^b No: PTV ^f
Stadlinguer et al. 2009 and 2012	mini-pigs (mandíbula)	Osstell®	Si	Si: BVD ^c
Blanco et al. 2012	conejos (fémur)	Osstell Mentor®	Si	
Andel Haq et al. 2011	ovejas (tibia)	Osstell Mentor®	No	
Antúñez et al. 2011	perros (mandíbula)	Osstell Mentor®	Si	Si: BA ^g

^aEIL = *Effective Implant Length* (longitud del implante efectiva); ^bITV = *Insertion Torque Value* (valor del torque de inserción); ^cBVD = *Bone Volume Density* (densidad del volumen de hueso); ^dnd = no determinado; ^eBTC = *Bone Trabecular Connectivity* (conectividad trabecular del hueso); ^fPTV = *Periotest® Value* (valores de Periotest®); ^gBA = *Bone Area in threads* (área en roscas).

Se han publicado cinco estudios clínicos sobre la correlación entre el AFR y parámetros histomorfométricos, tres en cadáveres y dos en pacientes, con diferentes resultados. Un estudio en cadáveres (Nkenke et al. 2003) encontró una débil correlación entre el BIC% en la cara vestibular del implante y el ISQ, pero no en la cara lingual. El estudio no pudo confirmar ninguna correlación entre los valores ISQ y los datos de torque de inserción máximos, ni entre los valores de ISQ y la densidad ósea mineral. Un segundo estudio en cadáveres realizado por Gedrange et al. (2005) para la determinación de la estabilidad primaria de implantes ortodónticos

palatales indicó una relación entre la FR y el BIC. Ambos, Nekenke et al. (2003) y Gedrange et al. (2005) encontraron una correlación positiva entre la altura del hueso cortical crestal y el ISQ. Jun et al. (2010) llevaron a cabo un experimento en tres cadáveres humanos para evaluar 3 parámetros de estabilidad inicial [ITV (*Insertion Torque Values*), ISQ y PTV (*Periotest[®] Values*)] de implantes inmediatos post-extracción y examinar la relación entre éstos y el BIC. Los parámetros de estabilidad inicial mostraron una correlación estadísticamente significativa entre ellos, pero sin embargo no se encontró correlación entre los parámetros de estabilidad primaria y el BIC. Tan solo en uno de los dos estudios en pacientes se halló una correlación estadísticamente significativa entre ISQ y BIC (Scarano et al. 2006). Dicho estudio consistió en el análisis histológico e histomorfométrico retrospectivo de siete implantes de titanio recuperados de humanos. Sin embargo, otro estudio en humanos, que también tenía en cuenta las diferentes características óseas (maxilar vs. mandibular), no encontró correlación entre mediciones de BVD (*Bone Volume Density*) o BTC (*Bone Trabecular Connectivity*) y los valores de ISQ (Huwiler et al. 2007). Curiosamente, en este estudio no se da ningún valor predictivo al AFR para la pérdida de la estabilidad del implante, ya que la disminución del valor se produjo después de los hechos.

Se han publicado varios estudios en animales, también con diferentes resultados. En un estudio en conejos (Meredith et al. 1997b) no se encontró correlación entre el grado de BIC y las mediciones de AFR, aunque se observó una fuerte correlación entre los valores de FR y la EIL (*Effective Implant Length*). Schliephake et al. (2006) no pudieron encontrar ninguna correlación entre el BIC% y los valores ISQ de 80 implantes en 10 perros de caza después de periodos de cicatrización de 1 o 3 meses. En un estudio en 30 conejos (Zhou et al. 2008) utilizando dos métodos, gammagrafía ósea y AFR, para evaluar la capacidad de osteointegración, se halló que la gammagrafía era más sensible a los cambios del hueso peri-implantario que el examen radiográfico digital, pero no se obtuvo correlación con los datos histomorfométricos (BIC). Sin embargo, se encontró que el AFR se incrementaba durante la fase de cicatrización y sí se correlacionaba con los datos histomorfométricos. Ito et al. (2008) llevaron a cabo un experimento en cuatro cerdos enanos, a los que se les colocaron 24 implantes en la tibia. Se analizó la FR e histologías a las 1, 2 y 4 semanas. Aunque la correlación entre la FR y el BIC, que se midió alrededor de todo el implante, no fue significativa ($r = 0.221$), el coeficiente

de correlación se incrementó ($r = 0.361$) cuando el BIC se midió en el cuello del implante. El estudio dirigido por Abrahamsson et al. (2009) para evaluar la relación entre el BIC y los valores de ISQ durante un periodo de cicatrización de 12 semanas en un experimento en perros Beagle, no encontró ninguna correlación entre los dos parámetros. Además, en el mismo experimento no se encontró correlación entre los valores ISQ y la densidad ósea. Sin embargo, Blanco et al. (2011) estudiando la influencia sobre la osteointegración temprana de implantes dentales instalados en conejos con dos protocolos de fresado diferentes, encontraron una correlación positiva entre el incremento de los valores ISQ y BIC. Por otra parte, en un estudio piloto experimental en ovinos, con el objetivo de comparar las características de osteointegración temprana de implantes estándar SLA (*Sandblasted Large Grit Acidetched*) y modificados (modSLA), no se encontró correlación entre el AFR y el BIC (Abdel-Haq et al. 2011). Una correlación débil entre el AFR y el BIC fue observada por Stadlinger et al. (2009 y 2012) utilizando implantes con un recubrimiento experimental (a base de colágeno y glicosaminoglicanos), colocados en mandíbula en 20 cerdos enanos. Finalmente, un estudio dirigido por Antunes et al. (2013) mostró correlación entre el AFR y el BIC usando DBBM (*Deproteinized Bovine Bone Mineral*) como material de injerto para promover la osteointegración y la estabilidad en implantes colocados en defectos óseos mandibulares de perros.

5.3. Ausencia de correlación entre ISQ y BIC %

En el presente estudio, llevando a cabo en perros Beagle, la correlación entre el AFR y el BIC se investigó durante un periodo de cicatrización de 8 semanas. El AFR se realizó con el aparato magnético Osstell Mentor[®], y la determinación de los valores de BIC, se estableció de acuerdo con un nuevo método, estandarizado, no-subjetivo y altamente discriminatorio, basado en imágenes BS-SEM (Manresa et al. 2013a). Para el estudio se usaron implantes con una superficie SBM (*Soluble Blasting Media*). Actualmente, en base a la evidencia de los datos histomorfométricos y estudios clínicos disponibles, es posible afirmar que las superficies rugosas ejercen una influencia clínicamente significativa a favor de una más rápida osteointegración (Cochran et al. 1998; Berglund et al. 2003; Buser et al. 2004; Abrahamsson et al. 2004; Tavares et al. 2007). Los parámetros de superficie del implante estimularían la reacción celular del hueso, dando lugar a una mayor respuesta de cicatrización y a BICs mejorados.

Los valores de FR evaluados por el aparato Osstell Mentor® se muestran en la Tabla 4.2 y Fig. 4.4. El análisis de los datos reveló una evolución similar de los valores ISQ en relación a los previamente descritos en animales de experimentación (Al-Nawas et al. 2006; Glauser et al. 2004) y estudios clínicos en pacientes (Nedir et al. 2004; Balshi et al. 2005; Boronat-López et al. 2006; Huwiler et al. 2007). En el momento de la instalación del implante el ISQ fue de 80,91 (valor promedio), disminuyendo la primera semana de cicatrización a 79,75. A continuación siguió un periodo (de las semanas 2 a 6) de valores crecientes. Y en la semana ocho el ISQ casi había vuelto a su valor inicial (81,08).

Los valores de medición del BIC obtenidos por la metodología BS-SEM se representan en la Tabla 4.1 y Fig. 4.2. Los resultados obtenidos con esta metodología de adquisición, procesado y análisis de imágenes mostró una evolución a lo largo del tiempo muy similar a la obtenida por otros autores en estudios comparables (Calvo-Girado et al. 2011; Klongnoi et al. 2006; Tavares et al. 2007; Abrahamsson et al. 2009; Ballo et al. 2009; Santis et al. 2011).

El análisis de los datos reveló que sólo se produjeron cambios menores de los valores de FR (ISQ) durante el periodo de cicatrización de ocho semanas. Sin embargo, el BIC% (valores de medias) experimentó un pequeño descenso hasta la semana 2, después de la cual fue aumentando significativamente hasta el último periodo evaluado (semana 8). En el presente estudio, no se encontró una correlación positiva entre el incremento en los valores de ISQ y el BIC (coeficiente de correlación de Spearman= -0.083; Fig. 4.5). Sin embargo, dado que sólo hay un perro por periodo de cicatrización, este estudio podría considerarse como mayormente de naturaleza descriptiva. Nuestros resultados son paralelos a resultados de estudios previos, que tampoco encontraron correlación entre AFR y parámetros histomorfométricos (Schliephake et al. 2006; Zhou et al. 2008; Ito et al. 2008; Abrahamsson et al. 2009; Jun et al. 2010; Abdel-Haq et al. 2011).

En varios estudios clínicos (Friberg et al. 1999; Becker et al. 2005) se ha afirmado que todos los implantes, independientemente de su estabilidad inicial, tienden a alcanzar un nivel similar de estabilidad. Estos resultados están apoyados parcialmente por otros estudios en conejos (Andersson et al. 2008), en los que se encontró que los implantes en hueso blando con estabilidad primaria baja mostraron un marcado incremento de la estabilidad en comparación con implantes en hueso denso. Por otra parte, en el experimento en conejos de Meredith et al. (1997b), se

expuso que los incrementos de la frecuencia de resonancia en el tiempo podían estar relacionados con el aumento de la rigidez de un implante en los tejidos circundantes, resultante de la formación de hueso nuevo y de la remodelación. Considerando estas observaciones, una explicación de la falta de correlación entre las mediciones del BIC y del AFR, tanto en nuestro experimento como en otros con resultados parecidos, podría ser que el grado de contacto con el hueso no necesariamente refleja la rigidez del hueso circundante. De hecho, en implantes de rugosidad moderada, tales como los que se usaron en este estudio (SBM) su superficie se cubre a menudo por una capa fina de hueso, la cual no es probablemente determinante para el apoyo biomecánico de los implantes. De acuerdo con Ito et al. (2008), el AFR con Osstell[®] mide rigidez, la cual es una combinación de contacto hueso-implante y densidad ósea alrededor del implante. Teniendo en cuenta este punto, no es sorprendente que la FR no se corresponda con el contacto hueso-implante histológico.

5.4. 2D BIC% vs. 3D BIC%

Se ha hipotizado que la inconsistencia en las correlaciones previamente publicadas entre el ISQ y el BIC podría ser debido al hecho de que la estabilidad del implante y el BIC% se midieron después de varias semanas o incluso meses de osteointegración, cuando el hueso en la interfase del área BIC puede llegar a estar completamente cicatrizado. Los autores también teorizan respecto a que la estabilidad aumenta con el grado de osteointegración, probablemente de una manera no lineal con respecto al tiempo. (Huang et al. 2013).

Muy recientemente, Hsu et al. han descrito en estudios de huesos artificiales (Hsu et al. 2013; Huang et al. 2013) que la estabilidad inicial del implante, según AFR, estaba correlacionada positivamente de forma contundente con el 3D BIC%, evaluado mediante tomografía microcomputarizada de alta resolución. Teniendo en cuenta que esta correlación no se encontró usando el 2D BIC%, los autores afirman que el 3D BIC% puede ser más representativo que el 2D BIC%, ya que sólo unas pocas secciones del 2D BIC, no pueden representar la tridimensionalidad de contacto entre el implante y el hueso (Ito et al. 2008; Liu et al. 2012). Sin embargo, este estudio tiene un valor limitado ya que utiliza modelos de hueso sintéticos para mimetizar la estructura celular avanzada del hueso. Debido a que el hueso real presenta propiedades biológicas más complejas que el hueso sintético, serán

Capítulo 5

necesarios más estudios en este área para dilucidar cómo la estabilidad primaria de un implante se ve afectada por el 3D BIC%.

Capítulo 6. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un nuevo método para medir el BIC basado en imágenes BS-SEM. Las imágenes obtenidas ofrecen un contraste excelente entre el hueso y el implante, lo cual permite que las imágenes sean procesadas para medir el BIC de forma objetiva, sistemática y altamente discriminativa.
2. Con el método propuesto el tiempo de procesamiento de las imágenes se reduce con respecto al método clásico para medir el BIC%.
3. El carácter no-destrutivo del procesamiento de las muestras permite su posterior observación histológica.
4. El porcentaje de BIC evaluado con el nuevo método es similar a los valores documentados en la bibliografía para implantes de rugosidad similar en modelos animales.
5. El presente experimento en mandíbula de perro Beagle no identificó correlación entre los parámetros histomorfométricos de osteointegración BIC y valores de ISQ
6. La ausencia de correlación entre estos dos parámetros está de acuerdo con estudios previos en humanos y animales.

Capítulo 7. ARTÍCULOS PUBLICADOS

**A new standardized-automatic method for bone-to-implant contact
histomorphometric analysis based on backscattered scanning electron
microscopy images**

Carolina Manresa¹, Manel Bosch², M^a Cristina Manzanares³, Patricia Carvalho⁴, José Javier Echeverría¹

¹Departament d'Odontostomatologia, Odontologia Integrada d'Adults, Facultat d'Odontologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²Unitat de Microscopia Òptica Avançada, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB), Barcelona, Spain

³Human Anatomy and Embryology Unit, DPyTEx, Health Universitat de Barcelona Campus (HUBc), Barcelona, Spain

Clin. Oral Impl. Res. 00, 2013, 1–5
doi: 10.1111/clr.12129

Accepted 21 December 2012

Carolina Manresa
Manel Bosch
María Cristina Manzanares
Patricia Carvalho
José Javier Echeverría

Short Communication

A new standardized-automatic method for bone-to-implant contact histomorphometric analysis based on backscattered scanning electron microscopy images

Authors' affiliations:

Carolina Manresa, José Javier Echeverría,
Departament d'Odontostomatologia, Odontologia
Integrada d'Adults, Facultat d'Odontologia,
Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
Manel Bosch, Unitat de Microscòpia Òptica
Avançada, Centres Científics i Tecnològics de la
Universitat de Barcelona (CCiTUB), Barcelona,
Spain
María Cristina Manzanares, Patricia Carvalho,
Human Anatomy and Embryology Unit, DPyTEx,
Health Universitat de Barcelona Campus (HUBc),
Barcelona, Spain

Corresponding author:

Carolina Manresa
Facultat d'Odontologia
Campus de Bellvitge
Universitat de Barcelona
Feixa Llarga
s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat
Barcelona, Spain
Tel.: (+34) 93 4024289
Fax: (+34) 93 4024248
e-mail: cmanresa@ub.edu

Key words: animal experiments, bone-implant interaction, morphometric analysis

Abstract

Aim: To establish an image analysis procedure for measuring the bone-to-implant contact (BIC) by a systematic non-subjective approach based on backscattered scanning electron microscopy (BS-SEM) images.

Material and methods: A total of 36 dental implants (9 mm length, Ø 4.0 mm with a SBM surface) were implanted in six beagle dog mandibles. The implants were removed after 1, 2, 4, 6, and 8 weeks and then embedded in resin and cut along their long axis. Sample observation was performed by BS-SEM, acquiring 10 to 16 images per sample. Image processing and BIC determination were performed using the Fiji image processing package. Images were stitched, filtered, and thresholded to obtain a binary image of the whole implant that finally was dilated and outlined. The length of this outline was measured as the maximum possible BIC. The regions of coincidence between this line and the bone were measured as the real BIC.

Results: The proposed methodology for BIC determination, based on SEM, which has a much higher resolution than optical microscopy, allows the acquisition of highly discriminative images with great contrast between implant and bone. The high resolution and high contrast in SEM images provide more accurate results than those obtained by classical methods. Furthermore, the methodology of image analysis described in this study delineates precisely and automatically the contour of the implant, which results in non-biased measurements. The average percentage of BIC was 35%, ranging from 24.7 to 45.5%. These values were similar to the results documented in the literature for implants of similar roughness in animal models.

Conclusions: A novel, non-subjective, and systematic method for measuring BIC is described based on BS-SEM images. The proposed methodology minimizes the shortcomings of the results obtained by previously described methods.

The evaluation methods of osseointegration could be categorized as invasive or non-invasive, by evaluating the implant *in situ* (*in vivo*) or *ex situ* (*ex vivo*) from the patient or experimental animals, respectively. The evaluation of *in vivo* functional implants is limited to different X-ray and resonance frequency methods. The most common methods for evaluation of retrieved implants (*ex vivo*) and surrounding tissue include the following: biomechanical tests, such as push or pull out or torque tests, and light microscopy, confocal laser scanning microscopy (CLSM), and scanning electron microscopy (SEM) observation of blocks, including the implant and surrounding tissues.

The histological assessment of bone adjacent to dental implants is mostly performed using variations of the sawing and grinding technique described by Donath & Breuner (1982) and the evaluation of stained thin sections by light microscopy. This is the standard methodology widely used for the determination of the histomorphometric parameter BIC% (percentage of bone-to-implant contact), which is defined as the percentage of implant length at which there is direct bone contact, without intervening fibrous tissue.

The drawbacks of the classical procedure, based on light microscopy, include need for staining, low resolution, time-consuming

Date:

Accepted 21 December 2012

To cite this article:

Manresa C, Bosch M, Manzanares MC, Carvalho P, Echeverría JJ. A new standardized-automatic method for Bone-to-Implant Contact histomorphometric analysis based on Backscattered Scanning Electron Microscopy images. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 2013, 1–5
doi: 10.1111/clr.12129

laboratory procedures, and the risk of bias in the microscopic evaluation. BIC determination by this methodology is performed in most cases, by drawing the line manually where the measurement is to be performed. In others studies, however, some digital image processing and analysis are carried out, but a well-defined workflow of image analysis is still lacking, and too much subjectivity could influence the final results. It would be desirable to have a simpler, highly discriminative, and less resource- and time-consuming method for BIC determination. Subsequently, research efforts are needed in this area to find alternative methods for performing this histomorphometric analysis.

Some studies have used CLSM to visualize high-contrast images of bone tissues without the need for sample processing and staining that are required in conventional light microscopy (Grötz et al. 1999; Al-Nawas & Götz 2003a; Orsini et al. 2007). CLSM has also been used to analyze the BIC in several studies (Al-Nawas et al. 2003b, 2008), acquiring the reflected light coming from the implant and from the tissue. In this method, the difference in intensities between both reflecting surfaces was used to distinguish them and later to measure the BIC.

On the other hand, the analysis could be performed in SEM mode with secondary and backscattering electrons. Several studies have been carried out using this technique for surface implant texturization (Marin et al. 2008; Ballo et al. 2009; Kelly et al. 2009; Jeong et al. 2010; Fontana et al. 2011; Johansson et al. 2012; Coelho et al. 2012). Recently, elemental analysis with SEM has been used to evaluate neoformed bone composition with different implant systems (Ballo et al. 2009; Calvo-Guirado et al. 2012). Nevertheless, to our knowledge, the determination of BIC based on SEM methodology has been scarcely reported so far (Chang et al. 2009; Lee et al. 2009; Vidigal et al. 2009; Calvo-Guirado et al. 2012).

In the present study, histomorphometric analysis by a new standardized and high discriminative method to quantify BIC based on scanning electron microscopy with backscattered electrons (BS-SEM) imaging is described. The measurements were performed along the total length of the implants, buccal and lingual.

Material and Methods

Animals and surgical procedure

According to the ARRIVE guidelines for reporting the animal experimentation

(Kilkenny et al. 2010; Berglundh & Stavropoulos 2012), the animal study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (AEEC) of the University of Barcelona (UB, Spain). To perform this observational study to describe a new BIC measurement technique, special attention has been paid to both, the reduction in the number of animals and to the reduction in the minimum of their suffering, according to the so-called "3Rs" (Replacement, Refinement, and Reduction of animals in research) as defined by Kilkenny et al. (2010). In this sense, six adult beagle dogs, weighing an average of 11.5 kg, were selected and installed in the animal experimentation service facility of Bellvitge's Health Science Campus of the UB, under veterinary control. All experiments were performed according to the Spanish Government guide (Royal Decree 1201/2005 of October 10th, Spanish Official Gazette 252, October 21st, 2005) and the European guide (European Union Council Directive of November 24th, 1986, 86/609/EEC) for animal use and care. Through the experimental study, all animals were fed with a soft diet, and mechanical cleaning of teeth and implants was performed daily.

All mandibular premolars were extracted bilaterally. After a healing period of 3 months, three implants (9 mm length, Ø 4.0 mm; Biohorizons® Implant Systems INC. Birmingham, AL, USA) with a SBM (sandblasting with soluble particles) surface were placed in each hemi-mandibular premolar region, according to the protocol suggested by the manufacturer (Biohorizons). The implants were placed at 7 mm distance from each other. A total of 36 implants were placed. All surgical procedures were performed by the same operator (C.M.). The surgical approach occurred under general anesthesia and was supervised by a veterinary surgeon. Once anaesthetized, buccal and lingual full-thickness flap were reflected, and implant placement procedure was carried out according to the manufacturer's instructions. Flaps were sutured using silk 4.0 interrupted sutures and removed after 10 days. After surgery, an intramuscular injection (prophylactically) of Terramycin 100® (25 mg/kg; Pfizer Laboratories, Alcobendas, Spain) was provided. The postoperative analgesia was carried out by the administration of meloxicam (5 mg/ml; 5 mg/20 Kg/24 h; Metamecam® injectable solution, Boehringer Ingelheim, Rhein, Germany). Finally, dogs were sacrificed at time points: 0, 1, 2, 4, 6, and 8 weeks after implant installation, by means of an overdose of sodium pentothal. The mandibles were dissected, and

each implant site was removed using a diamond saw, so samples could be obtained and prepared for histological analysis.

Specimen preparation and histomorphometric evaluation

The biopsies were processed for ground sectioning (Donath & Breuner 1982; Donath 1985). The implant-bone specimens were fixed in 10% formaldehyde for 1 week and dehydrated in ascending series of alcohol rinses before being embedded without decalcification in light-curing epoxy resin (Technovit®; Exakt-Kultzer, Wahrheim, Germany). Blocks were sectioned buccolingually with a diamond-edge band saw blade (Exakt micro-parallel-grinding System®; Exakt, Nordenstedt, Germany) and then ground and polished with 1200 and 4000 grain sandpaper to obtain a polished surface. The blocks were coated with evaporated carbon and fixed with colloidal silver; four silver tracks were directed to the region of interest to improve the conductivity of the specimen (Franch et al. 2000).

Image acquisition

Prior to the carbon coating, samples were observed under a Leica MZFLIII stereoscope to ensure the quality of the sectioned blocks. Images were acquired with a Cannon PowerShot A610 coupled to the stereoscope (Fig. 1a). After the carbon coating, the samples were analyzed using BS-SEM (S-360, Leica, Cambridge, UK), in the Scientific and Technological Centers of the University of Barcelona. All samples were observed in equal conditions (20 mm WD, 50× magnifications, 1 nA and 20 kV), and consecutive pictures (10 to 16 images per sectioned block) with at least 15% of overlap were obtained along the contour of the implant.

Image processing and BIC determination

Image processing and analysis were performed using the Fiji image processing package (<http://pacific.mpi-cbg.de/>). Images were stitched together with the Fiji stitching plugin (S. Preibisch et al. 2009) to have a composition of the whole section (Fig. 1b). This plugin allowed automatic stitching of all images in a directory, but it also allowed a 2D manual stitching approach when the former did not work properly.

The first step in the image analysis was to segment the implant. To do so, the stitched image was first filtered with a median filter of radius 2 and then thresholded for the maximum gray levels (200–255). This resulted in the binary image of the implant (Fig. 1c). A second step was to force a region of overlap between the implant and the bone. By

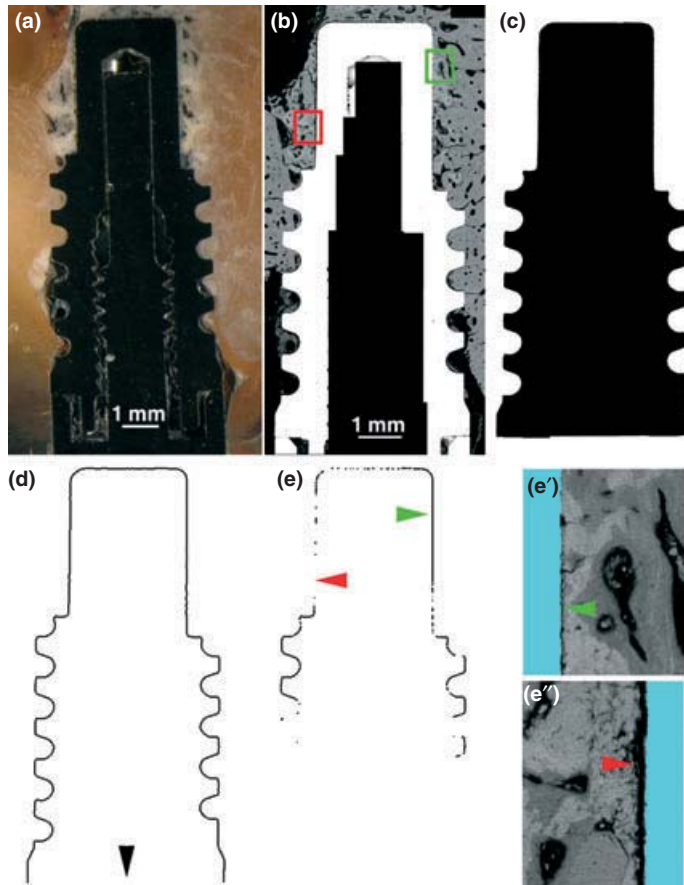


Fig. 1. Bone-to-implant contact (BIC) determination based on backscattered scanning electron microscopy (BS-SEM) images. (a) Stereoscopic image of one sample. (b) Stitched image of 14 BS-SEM images. Observe the difference in intensity between the implant (white) and tissue (gray). (c) Binary image of the segmented implant. (d) Outline of the implant after dilating. The external rim line is removed (black arrowhead). (e) Intersection line between (d) and (b). (e' and e'') Insets of green (e') and red (e'') areas in (b). Implant is colored in cyan. Green and red arrowheads in (e-e'') point out a region with and without BIC, respectively. Scale bar: 1 mm.

dilating the binary image six times, six pixels were added to the edges of the implant, enlarging it up to 15 μm on each side. This distance was adjusted to overcome the minimal separation observed between bone and implant (Fig. 1e'), probably due to the strain applied to the polymers embedding the block by the BS-SEM vacuum chamber. Larger distances were considered as absence of BIC (Fig. 1e''). The enlarged implant was finally outlined to generate a one-pixel-wide line (Fig. 1d) around it that was used to intersect the bone in the original image. The overlap between bone and outline was obtained (Fig. 1e) using the Boolean operation Min of the image calculator function of Fiji. This operation gave an image of a one-pixel-wide line where the outline of the implant intersected the bone and where the gray level was the minimum intensity between both. Therefore, the gray levels of the overlapping line were those from the bone, allowing further analysis in case differences in calcium concentration were to be investigated.

Finally, the percentage of BIC (buccolin-gual) was calculated. The length of the outline of the enlarged implant was considered the maximum possible BIC (100%), and the length of the overlapping line was considered the real BIC. Both measurements were performed after subtraction of the external rim line (Fig. 1d) where BIC is not possible. The percentage of BIC was calculated by dividing the real BIC by the maximum possible BIC and multiplying by 100.

Results and discussion

Backscattered electron (BS-SEM) imaging is a useful technique to assess differences in density for surface areas of calcified tissues, resulting in images with different gray levels (Franch et al. 2000; Roschger et al. 2003). The higher the density for a specific atomic structure of the mineral phase, the more electrons backscattered from the surface region and the brighter the resulting image

(Goldstein et al. 2005). Thus, calcified tissues show a gray level in the images depending on their calcium concentration, whereas the embedding material and the non-calcified tissues appear black (Fig. 1b and Fig. 3). The metallic implant, on the other hand, appears almost saturated at the maximum of the gray scale because of the high density of its titanium alloy.

The main limitation for conventional microscopy is the weaker contrast between the bone and the implant, unless some heavy staining is performed. CLSM, on the other hand, offers the possibility of acquiring images of the surface by detecting its reflection and thus without staining. In this case, a very good contrast between bone and implant is observed due to the high reflection of the implant. Some reflection from the soft tissues and the resin could interfere, however, giving rise to false positives (data not shown).

The method described in this study is based on the high contrast between bone and implant in BS-SEM images. This method offers several important advantages over the classical techniques based on the sawing-grinding processes (Donath & Breuner 1982) and the evaluation of stained thin sections by light microscopy (Abrahamsson et al. 2009; Calvo-Guirado et al. 2011; Santis et al. 2011). First, it avoids the risk of bias as there is no need for staining and the process of image analysis is standardized. Second, BIC measurements are more precise as BS-SEM images have a much higher resolution and a much higher contrast between implant and bone than conventional optical microscopy images. Third, this method allowed the analysis of the whole implant instead of individual areas, thus giving a more complete BIC measurement. However, if the interest is measuring BIC in a specific area, the proposed image analysis method is absolutely adaptable, precise, and robust. Fourth, the BS-SEM microscope can differentiate calcified tissues depending on their calcium concentration. The line where the real BIC was measured could be analyzed differentially based on its intensity levels, depending on the calcium concentration detected in the image. In addition, the morphological characteristics of the calcified tissues, such as the size and shape of the cell's lacunae, and the cementing lines could also be assessed and submitted to quantitative analysis (López-López et al. 2009). Fifth, BS-SEM imaging is non-destructive and therefore allows a posterior histological observation of the samples. Moreover, in comparison with

Table 1. Bone-to-implant contact percentage

Time (weeks)	BS-SEM	BS-SEM	SD
	Median	Mean	
0	22.3	24.7	11.64
1	23.4	23.7	4.78
2	25.8	22.9	7.43
4	34.2	36.2	11.54
6	30.0	33.0	16.52
8	44.3	45.5	17.16

SD, standard deviation; BS-SEM, backscattered scanning electron microscopy.

the classical methods, the time to process and analyze the samples is reduced. Finally, the method used to measure BIC described in this work could also be applied to images coming from conventional optical microscopy and CLSM.

The results obtained with this methodology of image acquisition, processing, and analysis showed an evolution along time very similar to that obtained by other authors in

comparable studies (Klongnoi et al. 2006; Tavares et al. 2007; Abrahamsson et al. 2009; Ballo et al. 2009; Calvo-Guirado et al. 2011; Santis et al. 2011). The mean of the percentages of BIC measurements for each time point are depicted in Table 1 and Fig. 2. In the first periods, from time 0 to week 2, the percentage of BIC was <30%. Images corresponding to those values and timing showed that the calcified tissues around the implant were immature and surrounded by vascular spaces (Fig. 3a–c). From the 4th week, the percentage of BIC clearly increased up to the last time point of the experiment (8 weeks). Images at the 4th week showed a higher level of contact between the implant and a denser osseous structure with fewer and smaller vascular spaces and more mature bone tissue (Fig. 3d). At weeks 6 and 8, the increase in the percentage of BIC was in parallel with the increase in maturity of the osseous tissue that gradually surrounded the implant surface (Fig. 3e,f).

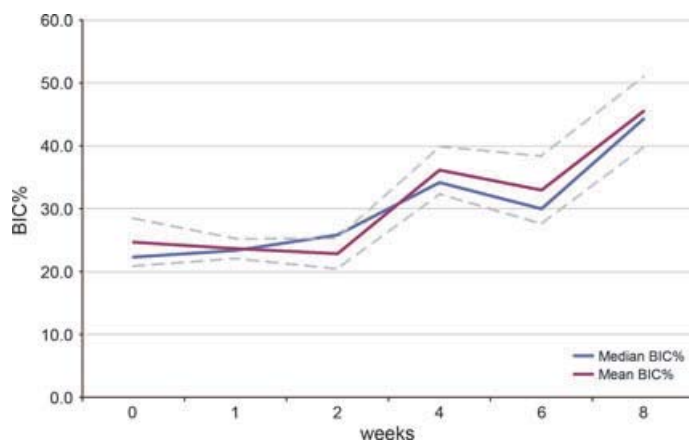


Fig. 2. Mean and median values of BIC% in the eight-week measurement period of the study. Each value corresponds to six implant units. Dashed lines correspond to 95% confidence interval.

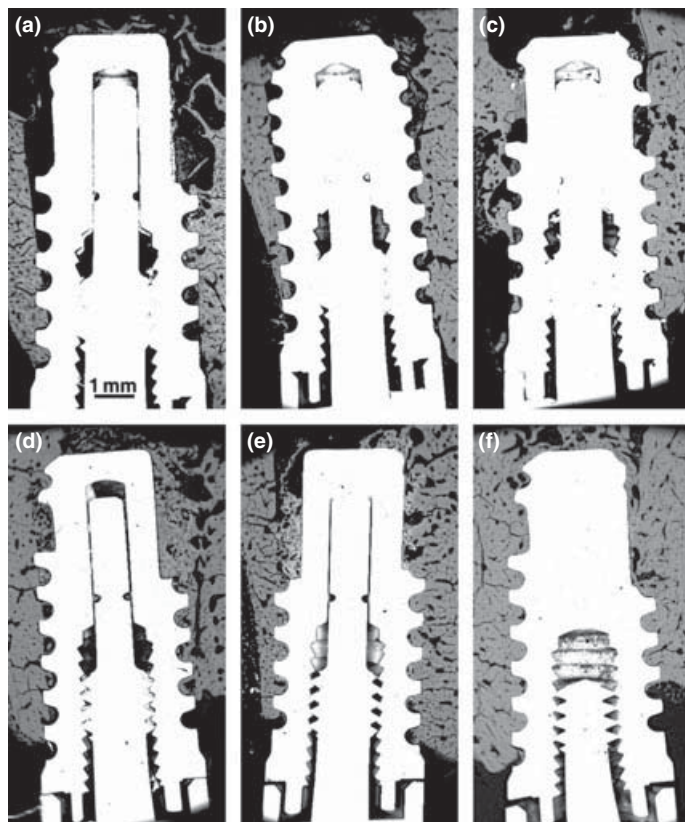


Fig. 3. Progression of bone-to-implant contact (BIC). (a–f) Backscattered scanning electron microscopy images of different implants at 0, 1, 2, 3, 4, 6, and 8 weeks, respectively. Observe the increase in the BIC along time. All images at the same scale.

Conclusions

A novel method for measuring BIC based on BS-SEM images is described. The obtained images offer an excellent contrast between bone and implant, which allows the images to be processed for measuring the BIC in an objective, systematic, and high discriminative way. Another advantage is that the time to process the samples is reduced with regard to the classical method of measuring BIC. As the proposed method is a non-destructive one, it allows a posterior histological observation of the samples. The percentage of BIC achieved with the novel method was similar to the values documented in the literature for implants of similar roughness in animal models.

Acknowledgements: The generous support of this research project by Biohorizons Inc. is gratefully acknowledged.

References

Abrahamsson, I., Linder, E. & Lang, N.P. (2009) Implant stability in relation to osseointegration: an experimental study in the Labrador dog. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 313–318.

Al-Nawas, B. & Götz, H. (2003a) Three-dimensional topographic and metrologic evaluation of dental implants by confocal laser scanning microscopy. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **5**: 176–183.

Al-Nawas, B., Götz, H., Grötz, K.A. & Duschner, H. (2003b) Standardized characterization of

- peri-implant bone structure using confocal laser scanning microscopy (CLSM). *European Cells and Materials IV* 5: 53.
- Al-Nawas, B., Groetz, K.A., Goetz, H., Duschner, H. & Wagner, W. (2008) Comparative histomorphometry and resonance frequency analysis of implants with moderately rough surfaces in a loaded animal model. *Clinical Oral Implants Research* 19: 1–8.
- Ballo, A.M., Akca, E.A., Ozen, T., Lassila, L., Vallittu, P.K. & Närhi, T.O. (2009) Bone tissue responses to glass fiber-reinforced composite implants - A histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research* 20: 608–615.
- Berglundh, T. & Stavropoulos, A. (2012) Preclinical in vivo research in implant dentistry. Consensus of the eighth european workshop on periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 39: 1–5.
- Calvo-Guirado, J.L., Aguilar-Salvatierra, A., Guardia, J., Delgado-Ruiz, R., Ramírez-Fernández, M. P., Pérez Sánchez, C. & Gómez-Moreno, G. (2012) Evaluation of periimplant bone neoformation using different scanning electron microscope methods for measuring BIC. A dog study. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* 4: e8–e13.
- Calvo-Guirado, J.L., Mate-Sanchez, J., Delgado-Ruiz, R., Ramirez-Fernández, M.P., Cutando-Soriano, A. & Peña, M. (2011) Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study. *Clinical Oral Implants Research* 22: 587–593.
- Chang, C.-S., Lee, T.-M., Chang, C.-H. & Liu, J.-K. (2009) The effect of microrough surface treatment on miniscrews used as orthodontic anchors. *Clinical Oral Implants Research* 20: 1178–1184.
- Coelho, P.G., Marin, C., Granato, R., Giro, G., Suzuki, M. & Bonfante, E.A. (2012) Biomechanical and histologic evaluation of non-washed resorbable blasting media and alumina-blasted/acid-etched surfaces. *Clinical Oral Implants Research* 23: 132–135.
- Donath, K. (1985) The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue (sage-schliff (sawing and grinding) technique). *Pathology Research and Practice* 179: 631–633.
- Donath, K. & Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. the sage-schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology* 11: 318–326.
- Fontana, F., Rocchietta, I., Addis, A., Schupbach, P., Zanotti, G. & Simion, M. (2011) Effects of a calcium phosphate coating on the osseointegration of endosseous implants in a rabbit model. *Clinical Oral Implants Research* 22: 760–766.
- Franch, J., Pastor, J., Franch, B., Durall, I., Manzanares, M.C. & Feline, J. (2000) Back-scattered electron imaging of a non-vertebral case of hypervitaminosis A in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2: 49–56.
- Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Echlin, P., Roming, A.D., Lyman, C.E., Fiori, C. & Lifshin, E. (2005) Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. New York, NY: Kluwer Academic/Penum Publishers.
- Grötz, K.A., Piepkorn, B., Al-Nawas, B., Duschner, H., Bittinger, F., Kann, P., Beyer, J. & Wagner, W. (1999) Confocal laser scanning microscopy: a non-destructive subsurface histotomography of healthy human bone. *Calcified Tissue International* 65: 8–10.
- Jeong, R., Marin, C., Granato, R., Suzuki, M., Gil, J. N., Granjeiro, J.M. & Coelho, P.G. (2010) Early bone healing around implant surfaces treated with variations in the resorbable blasting media method. A study in rabbits. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal* 15: e119–e125.
- Johansson, C.B., Gretzer, C., Jimbo, R., Mattisson, I. & Ahlberg, E. (2012) Enhanced implant integration with hierarchically structured implants: a pilot study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* 23: 943–953.
- Kelly, J., Lin, A., Wang, C.J., Park, S. & Nishimura, I. (2009) Vitamin D and bone physiology: demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model. *Journal of Prosthodontics* 18: 473–478.
- Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M. & Altman, D.G. (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 1: 94–99.
- Klongnoi, B., Rupprecht, S., Kessler, P., Thorwarth, M., Wiltfang, J. & Schlegel, K.A. (2006) Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation: an explorative study. *Clinical Oral Implants Research* 17: 312–320.
- Lee, J., Sieweke, J.H., Rodriguez, N.A., Schupbach, P., Lindstrom, H., Susin, C. & Wikesjö, U.M. (2009) Evaluation of nano-technology-modified zirconia oral implants: a study in rabbits. *Journal of Clinical Periodontology* 36: 610–617.
- López-López, J., Chimenos-Küstner, E., Manzanares-Cespedes, C., Muñoz-Sánchez, J., Castañeda-Vega, P., Jané-Salas, E., Alvarez-López, J.M. & Gimeno-Sanding, A. (2009) Histomorphological study of the bone regeneration capacity of platelet-rich plasma, bone marrow and tricalcium phosphate: experimental study on pigs. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal* 14: e620–e627.
- Marin, C., Granato, R., Suzuki, M., Gil, J.N., Piattelli, A. & Coelho, P.G. (2008) Removal torque and histomorphometric evaluation of bioceramic grit-blasted/acid-etched and dual acid-etched implant surfaces: an experimental study in dogs. *Journal of Periodontology* 79: 1942–1949.
- Orsini, G., Piattelli, M., Scarano, A., Petrone, G., Kenealy, J., Piattelli, A. & Caputi, S. (2007) Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *Journal of Periodontology* 78: 209–218.
- Preibisch, S., Saalfeld, S. & Tomancak, P. (2009) Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* 25: 1463–1465.
- Roschger, P., Gupta, H.S., Berzlanovich, A., Ittner, G., Dempster, D.W., Fratzl, P., Cosman, F., Parisien, M., Lindsay, R., Nieves, J.W. & Klaushofer, K. (2003) Constant mineralization density distribution in cancellous human bone. *Bone* 32: 316–323.
- Santis, E.D., Botticelli, D., Pantani, F., Pereira, F.P., Beolchini, M. & Lang, N.P. (2011) Bone regeneration at implants placed into extraction sockets of maxillary incisors in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 22: 430–437.
- Tavares, M.G., Tambasco De Oliveira, P., Nanci, A., Hawthorne, A.C., Rosa, A.L. & Xavier, S.P. (2007) Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H2SO4/H2O2 enhances contact osteogenesis. *Clinical Oral Implants Research* 18: 452–458.
- Vidigal, G.M., Groisman, M., Gregório, L.H. & Soares, G.D.A. (2009) Osseointegration of titanium alloy and HA-coated implants in healthy and ovariectomized animals: a histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research* 20: 1272–1277.

**The comparison between implant stability quotient and bone-implant
contact revisited: an experiment in Beagle dog**

Carolina Manresa¹, Manel Bosch², José Javier Echeverría¹

¹Departament d'Odontoestomatologia, Odontologia Integrada d'Adults, Facultat
d'Odontologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²Unitat de Microscopia Òptica Avançada, Centres Científics i Tecnològics de la
Universitat de Barcelona (CCiTUB), Barcelona, Spain

Clin. Oral Impl. Res. 00, 2013, 1–9
doi: 10.1111/clr.12256

Accepted 4 August 2013

Carolina Manresa
Manel Bosch
José J. Echeverría

The comparison between implant stability quotient and bone-implant contact revisited: an experiment in Beagle dog

Authors' affiliations:

Carolina Manresa, José J. Echeverría, Departament d'Odontostomatologia, Odontologia Integrada d'Adults, Facultat d'Odontologia, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
Manel Bosch, Unitat de Microscòpia Òptica Avançada, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB), Barcelona, Spain

Corresponding author:

Carolina Manresa
Facultat d'Odontologia
Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona
Feixa Llarga, s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat
Barcelona, Spain
Tel.: +34 934024289
Fax: +34 934024248
e-mail: cmanresa@ub.edu

Key words: backscattered scanning electron microscopy, bone-to-implant contact, histomorphometric analysis, implant stability, osseointegration, resonance frequency

Abstract

Background: Resonance frequency analysis (RFA) is applied clinically for the assessment of implant stability, and the relevance of this application is widely accepted. However, the relationship between resonance frequency (RF) and other parameters of implant stability, such as the histomorphometrical bone-to-implant contact (BIC) parameter, has become controversial in the last decade.

Objective: To analyse and clarify the controversial relationship between RF and histomorphometrical BIC measurements.

Material and methods: A total of 36 dental implants (9 mm length, Ø 4.0 mm; Biohorizons® Implant Systems Inc., Birmingham, AL, USA) with a soluble blasting media (sandblasting with soluble particles) surface were implanted in six beagle dog mandibles. RFA assessments were performed with a magnetic Ostel Mentor® device at the time of implant installation, and during the monitoring period at weeks 1, 2, 4, 6 and 8, before implant retrieval. The dogs were sacrificed and the implants were removed in block after 8, 6, 4, 2, 1 and 0 weeks, respectively. One group was obtained at time 0, immediately after the implantation. The samples were embedded in methyl methacrylate polymers (Technovit®) and cut along their long axis. BIC values were assessed by a non-subjective and systematic method based on backscattered scanning electron microscopy (BS-SEM) images. BIC% at the different time points was compared with the corresponding implant stability quotient (ISQ) values of the RFA assessment.

Results: No statistically significant correlation between BIC and ISQ values (Osstell Mentor®) was identified. The absence of a relationship between these two parameters is in agreement with several previous studies in humans and experimental animals.

Conclusions: The lack of correlation between BIC and ISQ values suggests that ISQ as determined by RFA is not able to identify the relationship between RF and histomorphometrical data.

For the successful osseointegration of an implant, a structural and functional connection between bone and implant surface is necessary. Primary stability at the time of installation involves the mechanical engagement of an implant to the surrounding bone (Lioubavina-Hack et al. 2006). Secondary stability follows, which is the biological stability gained with bone regeneration and remodelling around the implant, that is, osseointegration.

Implant stability is the main parameter that influences the schedule of implant loading and the outcome of the treatment (Jaffin & Berman 1991; Chiapasco et al. 1997; Lazzara et al. 1998; Szmukler-Moncler et al. 1998;

Testori et al. 2002). Factors affecting primary stability would be bone quantity and quality, surgical technique (including the skill of the surgeon) and type of implant (geometry, length, diameter and surface characteristics). The mechanical properties of bone are determined by the composition of the bone at the implant site and may increase during healing because soft trabecular bone tends to undergo a transformation to dense cortical bone at the vicinity of the implant surface (Sennerby & Meredith 2008). On the other hand, factors affecting secondary stability would be primary stability, bone modelling and remodelling, and implant surface conditions (Meredith 1998b; Atsumi et al. 2007).

Date:

Accepted 4 August 2013

To cite this article:

Manresa C, Bosch M, Echeverría JJ. The comparison between implant stability quotient and bone-implant contact revisited: an experiment in Beagle dog. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 2013, 000–000
doi: 10.1111/clar.12256

A number of approaches have been developed to measure implant stability using both invasive and non-invasive means. Among the invasive approaches, histomorphometrical assessment of implant–bone interface provides reliable data on the strength of the interface and the quality of implant anchorage in peri-implant bone. Bone-to-implant contact (BIC), bone volume density (BVD) and effective implant length (EIL) are some of the histomorphometrical parameters used for that purpose *ex-vivo*. The drawback of these measurement approaches is that they are only applicable in an experimental environment. On the other hand, for the quantitative assessment of bone mineral density *in vivo*, quantitative computed tomography (QCT) has been recently introduced. QCT is an accurate and reproducible method for the quantitative analysis of the mineral density of the residual bone. However, QCT does not offer the spatial resolution for an accurate analysis of the bone structure for which typically bone histomorphometry is used (Martinez et al. 2001). Other drawbacks of QCT are (i) a certain radiation exposure and (ii) results are severely impacted by metal components in the vicinity of the desired location.

Clinicians need non-destructive techniques and supporting objective guidelines to determine on an individual basis the stability of a given implant in its peri-implant bone. Currently, several non-invasive methods, such as torque measurements during implant insertion, radiographic assessment, the Periotest[®] instrument and resonance frequency analysis (RFA), have been clinically used (Meredith 1998a,b; Aparicio et al. 2006; Atsumi et al. 2007).

The torque value is the final twisting force of implant insertion. Although torque measurement during implant insertion is simple, this is not applicable in the process of treatment and follow-up (Friberg et al. 1999). Periotest[®], which was originally used for measurement of natural tooth mobility, has also been applied to test implant stability (Schulte & Lukas 1993; Aparicio 1997; Isidor 1998). The Periotest[®] assesses the damping capacity of the implant, although it is not useful to evaluate mesiodistal stability. In addition, Periotest[®] seems to be insufficient to detect small changes in implant stability, because the direction and position of the Periotest[®] probe affect the value. On the other hand, Meredith et al. (1996) have described a clinical non-invasive approach, named RFA, for the assessment of implant stability, which consist of evaluating bone anchorage around an implant by measuring the resonance fre-

quency of a transducer coupled to the implant (Meredith et al. 1996, 1997a,b). The instrument is a piezo-electric element with a frequency spectrum of 3500–8000 Hz. The frequency with the highest amplitude is used to calculate the so-called implant stability quotient (ISQ) on a scale from 0 to 100. According to the manufacturer, an almost linear relationship exists between the resonance frequency and the ISQ value.

In the process of implant treatment and the follow-up of the treatment, resonance frequency (RF) is superior to other analyses (radiographical analysis, cutting and insertion torque, and Periotest[®]). Measurement of implant stability through RFA is supposed to reduce the observer-dependent errors occurring with the Periotest[®], as a transducer is screwed on to the implant and measurements are completely automatized. The torque used during fixation of the transducer to the implant has been shown not to alter the results of RFA measurements, and the results obtained from this type of measurement were highly reproducible (Meredith et al. 1996). Currently, several versions of the RFA devices are available: the original is an electronic apparatus (Osstell[®]), whereas the more recent ones are wireless magnetic devices (Osstell Mentor[®] [Integration Diagnostics, Gothenburg, Sweden] and Osstell ISQ[®]). The use of the magnetic apparatus compared with the predecessor was thought to result in improved accuracy of the RFA technique (Atsumi et al. 2007).

A number of experimental and clinical studies showed increasing RFA values during healing after implant placement. The RF changed according to the stiffness of the excited abutment–implant system. Thus, changes in implant RF could indicate changes in anchorage (Meredith et al. 1997a, b; Sennerby et al. 2005) and therefore may be useful in documenting clinical implant stability (Meredith et al. 1996; Meredith 1998a; Zix et al. 2008). In the last fifteen years, several studies have been published (Meredith et al. 1997b; Nkenke et al. 2003; Gedrange et al. 2005; Schliephake et al. 2006; Scarano et al. 2006; Huwiler et al. 2007; Zhou et al. 2008; Ito et al. 2008; Abrahamsson et al. 2009; Stadlinger et al. 2009; Stadlinger et al. 2012; Jun et al. 2010; Blanco et al. 2011; Abdel-Haq et al. 2011; etc.) trying to establish the validity of RFA in the assessment of implant–bone anchorage by correlation of ISQ values and histomorphometrical parameters (Table 1).

The comparison of the literature in this area is difficult because of the heterogene-

ity of the studies and nature of the tests: (i) different types of histomorphometrical analysis: BIC (total, buccal or lingual), BVD (bone volume density), EIL (effective implant length), etc.; (ii) *in vivo* vs. *in vitro* experiments; (iii) animal vs. human studies; (iv) cadavers vs. patients; (v) different animal models – rabbits, dogs, mini-pigs, sheeps, etc. – in mandible, tibia, femur, etc.; and (vi) variations in macro and micro implant design. Subsequently, conclusive data on the relationship between bone–implant interface and RFA values are still lacking. It is worth mentioning that all the histomorphometrical measurements of BIC in these studies have been carried out by the conventional procedure, analysing the stained samples with light microscopy. Regarding the equipment used for measuring RF, the assessment of the ISQ values was performed with the electronic Osstell[®] device. The more accurate magnetic Osstell Mentor[®] device was used only in four studies.

Therefore, the aim of the present study was to test the hypothesis that measurements of implant stability using RFA correlate with histomorphometrical data of BIC in a beagle dog experiment. Special attention was paid to the acquisition of the data to be correlated. In this study, BIC assessment has been performed by a non-subjective and systematic method based on BS-SEM images (Manresa et al. 2013), and RFA values were assessed using the improved magnetic Osstell Mentor[®] device. The data obtained from this animal experiment might be useful in clarifying the current controversial relationship between RF and histomorphometrical parameters.

Material and methods

Experimentation animals

According to the ARRIVE guidelines for reporting the animal experimentation (Kilkenny et al. 2010; Berglundh & Stavropoulos 2012), this animal study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona (UB, Spain). To perform this study, the number of animals was reduced to a minimum, according to the “3Rs” (Replacement, Refinement and Reduction of animals in research) as defined by Kilkenny et al. (2010). Thus, six adult beagle dogs, weighing an average of 11.5 kg, were selected and installed in the animal experimentation service facility of Bellvitge’s Health Science Campus of the UB, under veterinary control. The design of the study is depicted in Fig. 1. All experiments were

Table 1. Review of the literature on the correlation between ISQ and BIC measurements

Authors	Experiment	RFA device	Correlation ISQ-BIC	Correlation of RFA with other parameters
Meredith et al. (1997b)	Rabbits (tibiae)	Osstell®	No	Yes: EIL
Nkenke et al. (2003)	Cadaver	Osstell®	Yes (buccal side)	No: ITV
Gedrange et al. (2005)	Cadaver	Osstell®	Yes	No: Bone mineral density
Schliephake et al. (2006)	Dogs (mandible)	Osstell®	No	No: Bone density (radiographic evaluation)
				No: ITV
				No: BVD
Scarano et al. (2006)	Clinical study	Osstell®	Yes	
Huwiler et al. (2007)	Clinical study	Osstell®	nd	No: BVD
				No: BTC
Zhou et al. (2008)	Rabbits	Osstell®	Yes	No: Bone scintigraphy
Ito et al. (2008)	Mini-pigs (tibiae)	Osstell®	No	
Abrahamsson et al. (2009)	Dogs (mandible)	Osstell®	No	No: Bone density
				No: EIL
				No: ITV
Jun et al. (2010)	Cadáver	Osstell® Osstell Mentor®	No	No: PTV
				Yes: BVD
Stadlinger et al. (2009 and 2012)	Mini-pigs (mandible)	Osstell®	Yes	
Blanco et al. (2011)	Rabbits (femur)	Osstell Mentor®	Yes	
Abdel-Haq et al. (2011)	Sheep (tibiae)	Osstell Mentor®	No	
Antunes et al. (2013)	Dogs (mandible)	Osstell Mentor®	Yes	Yes: BA

EIL, effective implant length; ITV, insertion torque value; BVD, bone volume density; nd, not determined; BTC, bone trabecular connectivity; PTV, periosteal value; BA, bone area in threads.



Fig. 1. Design of the study.

performed according to the Spanish Government guide (Royal Decree 1201/2005 of October 10th, Spanish Official Gazette 252, October 21st, 2005) and the European guide (European Union Council Directive of November 24th, 1986, 86/609/EEC) for animal use and care. Throughout the experimental study, all animals were fed with a soft diet, and mechanical cleaning of teeth and implants was performed daily.

Surgical procedure

All mandibular premolars were extracted bilaterally (Fig. 2a,b). After a healing period of 3 months, three implants (9 mm length, Ø 4.0 mm; Biohorizons® Implant Systems Inc., Birmingham, AL, USA) with a soluble blasting media (SBM) (sandblasting with soluble particles) surface were placed in each hemimandibular premolar region, according to the protocol suggested by the manufacturer (Biohorizons).

The implants were placed at 7 mm distance from each other. A total of 36 implants were placed (Fig. 2c). All surgical procedures were performed by the same operator (C. M.). The surgical approach occurred under general anaesthesia and was supervised by a veterinary surgeon. Once anaesthetized, buccal and lingual full thickness flaps were reflected. Implants placement procedure was carried out according to the manufacturer's instructions and protocols, to ensure a standardized surgical procedure. For all implant installation, insertion torque was stabilized at 40 Ncm. Flaps were sutured using silk 4.0 interrupted sutures and removed after 10 days. After surgery, an intramuscular injection (prophylactically) of Terramycin 100® (Pfizer Laboratories, Alcobendas, Madrid, Spain, 25 mg/kg) was provided. The post-operative analgesia was carried out by the administration of meloxicam (Metamecam® injectable solution 5 mg/ml,

Rhein, Germany; 5 mg/20 kg/24 h). Finally, dogs were sacrificed at time points: 0, 1, 2, 4, 6 and 8 weeks after implant installation, by means of an overdose of sodium pentothal. The mandibles were dissected and each implant site was removed using a diamond saw, so samples could be obtained and prepared for histological analysis.

Resonance frequency measurements with Osstell Mentor® device

Immediately after implant installation, ISQ assessments of all implants were performed according to the manufacturer's instructions. The SmartPeg® (type 1, Integration Diagnostics AB, Gothenburg, Sweden) was directly screwed into the implants inside thread. The hand-held probe of Osstell Mentor® stimulates the SmartPeg magnetically, without being connected to it, and RFA was measured (Fig. 2d). Measurements were taken twice

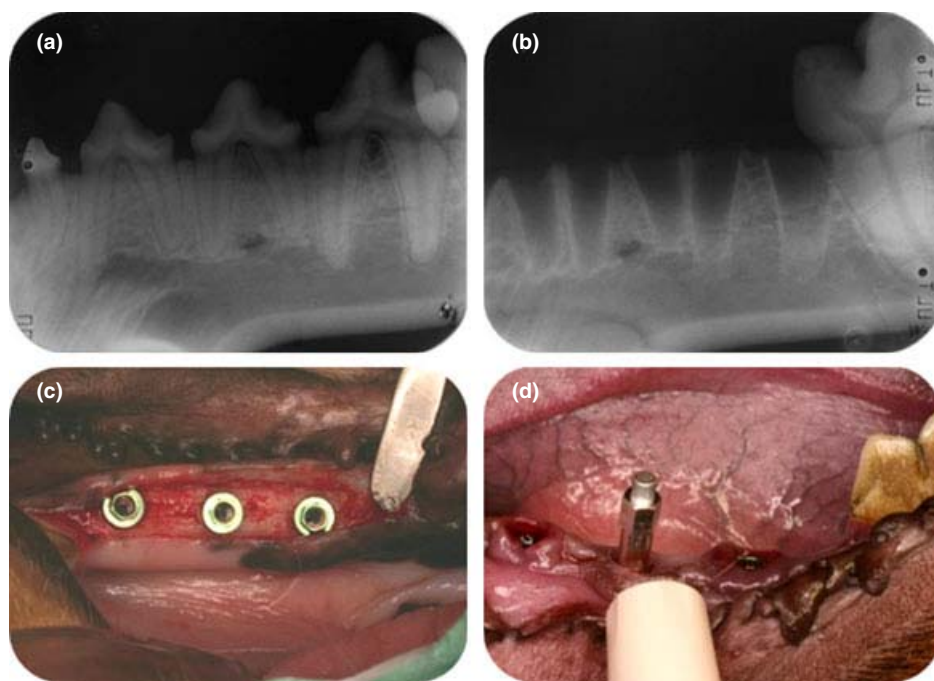


Fig. 2. Premolar extraction (a and b); Implant placement after 3 months of healing (c); Assessment of ISQ values (d).

with the hand-held probe in a direction perpendicular to the mandibular crest. The Osstell Mentor[®] device automatically transformed the RFA value (in hertz) for each assessment to ISQ units. Values between 1 and 100 were obtained, 100 being the highest degree of stability. The healing following implant installation was studied at 0, 1, 2, 4, 6 and 8 weeks, measuring implant stability at each time point.

Finally, dogs were sacrificed at time points: 0, 1, 2, 4, 6 and 8 weeks after implant installation, so samples could be obtained and prepared for histological analysis.

Preparation of samples

The biopsies were processed for ground sectioning (Donath & Breuner 1982; Donath 1985). The implant-bone specimens were fixed in 10% formaldehyde for 1 week and dehydrated in an ascending series of alcohol rinses before being embedded without decalcification in light-curing epoxy resin (Technovit[®], Exakt-Kultzer, Wahrheim, Germany). Blocks were sectioned buccolingually with a diamond-edge band saw blade (Exakt micro-parallel-grinding System[®], Exakt, Nordenstedt, Germany), and then ground and polished with 1200 and 4000 grain sandpaper to obtain a polished surface. For each implant, one section at each half longitudinally axis (buccal-lingual) was prepared. The blocks were coated with evaporated carbon and fixed with colloidal silver; four silver tracks were directed to the region of interest

in order to improve the conductivity of the specimen (Franch et al. 2000).

Histomorphometric analysis

Sample observation and BIC measurements were performed as described previously (Manresa et al. 2013) by BS-SEM (S-360; Leica, Cambridge, UK), at the Scientific and Technological Centers of the UB, acquiring 10–16 images per sample. Image processing and BIC determination was performed using the Fiji image processing package (<http://pacific.mpi-cbg.de/>). Images were stitched (Preibisch et al. 2009), filtered and thresholded to obtain a binary image of the whole implant that finally was dilated and outlined. The length of this outline was measured as the maximum possible BIC. In the present study, the measurements were performed along the total length of the implants, buccal and lingual. The regions of coincidence between this line and the bone were measured as the real BIC. The percentage of BIC was calculated by dividing the real BIC by the maximum possible BIC and multiplying by 100.

Statistical analysis

Data obtained from each section in the histological analyses and from each implant in the RFA were coalesced, and mean values were calculated for each healing time. Degree of osseointegration (BIC%) was compared with the ISQ values for the corresponding implant sites using the Spearman correlation coefficients. In the correlation analysis, the

implant was used as the statistical unit ($N = 36$). Statistical analysis was performed with SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Good primary stability was achieved for all implants after installation. Healing was uneventful in all the 36 implant sites, and no implant exhibited clinical mobility at any time point.

ISQ values

At the time of implant installation, the ISQ mean values (Fig. 3; Table 2) were 80.91. From day 0 to 1 week, a small decrease in the RFA value was observed (79.75). The ISQ value increased from week 1 to week 2 (81.17). From week 2 to week 4, the RFA values remained stable (81.58), and then rose to 83.75 at week 6. Finally, after 8 weeks, a small decrease in ISQ data was noticed, the mean value being 81.08, very close to the initial value.

Histomorphometrical measurements (BIC%)

The results of the histological analysis of the ground sections are depicted in Fig. 4 and Table 3. Considering the mean values for each time point, BIC% amounted to 24.70% immediately following implant installation. After 1 week of healing, the BIC% decreased to 23.70 and then to 22.90% at week 2. From week 2 to week 6, the BIC% gradually increased, being 36.20 and 33.0, respectively, at 4 and 6, weeks. Finally, at week 8, the BIC% value was established as 45.50%. Fig. 5 shows the progression of bone-to-implant contact along time. Although only one spire is represented for each sample, the BIC measurement was carried out along the total length of the implant. Images corresponding to the earliest periods, from time 0 to week 2, showed that the calcified tissues around the implant were immature and surrounded by vascular spaces (Fig. 5a–c). Images at the 4th week showed a higher level of contact between the implant and a denser osseous structure with fewer and smaller vascular spaces and more mature bone tissue (Fig. 5d). At weeks 6 and 8, the increase in the BIC% was in parallel with the increase in maturity of the osseous tissue that gradually surrounded the implant surface (Fig. 5e,f).

ISQ and BIC correlation

Differences in BIC% were not reflected in the RFA during the 8-week monitoring period. There was no statistically significant

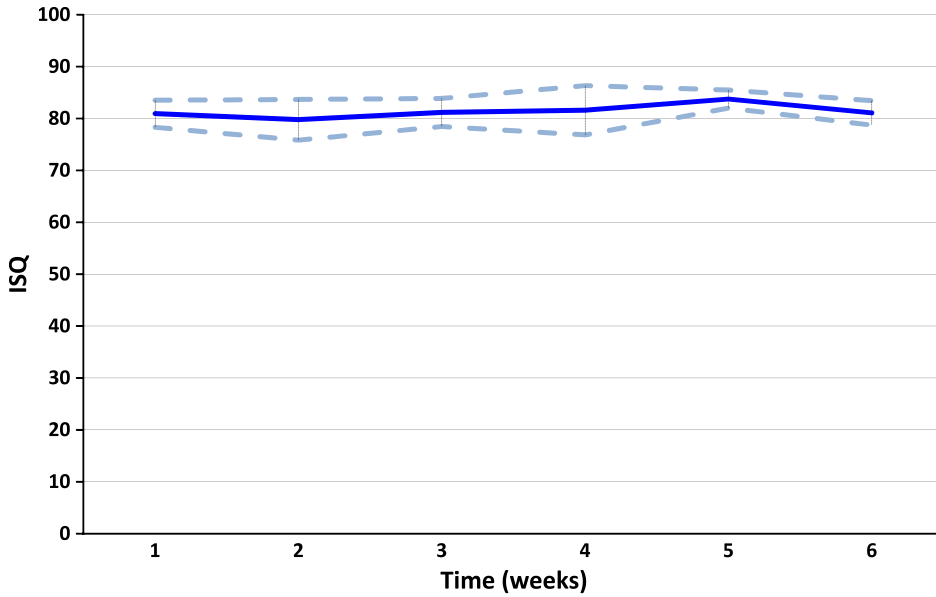


Fig. 3. Diagram of the Implant Stability Quotient (ISQ values) obtained with the Osstell Mentor® device from day 0 to week 8. Standard deviation (SD) shown in dashed lines.

Table 2. Implant stability quotient (ISQ values) for all RF assessment

Time (weeks)	ISQ values – Osstell Mentor®				
	Mean	SD	Q25	Median	Q75
0	80.91	3.26	80.25	81.50	83.13
1	79.75	4.92	75.62	79.75	84.25
2	81.17	3.37	81.00	81.50	82.75
4	81.58	5.96	83.13	83.75	84.38
6	83.75	2.19	82.88	84.50	85.00
8	81.08	2.94	80.25	81.50	82.75

SD, standard deviation; Q25, quartile 1 (25%); Q75, quartile 3 (75%).

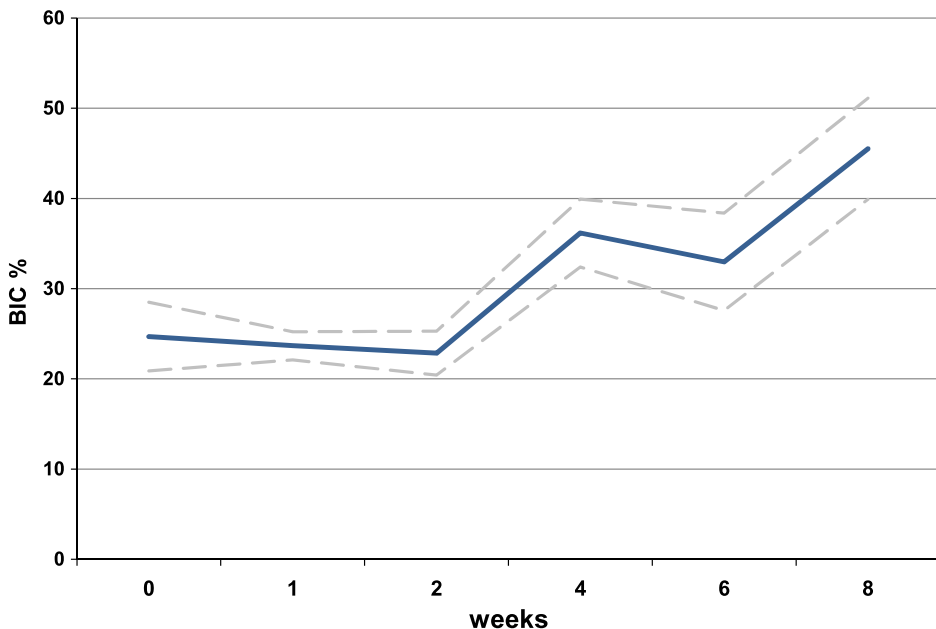


Fig. 4. Diagram of the degree (mean values) of osseointegration [bone-to-implant contact (BIC%)] from day 0 to week 8. Values obtained with backscattering scanner electron microscopy (BS-SEM). Standard deviation (SD) shown in dashed lines.

correlation between RFA and BIC values (Spearman correlation coefficient = -0.083 Fig. 6).

Discussion

Resonance frequency analysis is believed to be a potentially useful clinical tool for the prevention, diagnosis and prediction of implant failure and is helpful in the maintenance of viable implants (Meredith 1998a; Huang et al. 2002; Glauser et al. 2004; Sjöström et al. 2005; Zix et al. 2008). However, the validity of this rather new technique still has to be determined by correlating the results with other methods that assess the supportive character of an implant site, such as mechanical testing, radiological examination and, finally, histometric analysis.

Histological and histomorphometrical assessment is the most accurate method of observing morphological changes at the implant–bone interface. It has been suggested that RFA is related to the stiffness of the implant in the surrounding tissues (Meredith et al. 1996, 1997a,b). The stiffness of the implant–bone unit that is supposed to be assessed by RFA may be affected by the thickness of the bone layer on the implant surface and the density of the peri-implant bone. Hence, an increased bone–implant contact is supposed to result in higher structure stiffness and would increase interfacial strength (Gedrange et al. 2005; Sennerby et al. 2005). Different results on a possible relationship between RFA and BIC have been reported. The literature in this area is controversial and, without being exhaustive, some representative examples of studies on positive and negative correlations between RFA and histomorphometrical parameters, in clinical and experimental settings, are summarized in Table 1 and described below.

Five clinical studies on the correlation between RFA and histomorphometrical parameters, three in cadavers and two in patients, have been published with different outcomes. A study on human cadavers (Nkenke et al. 2003) found a weak correlation between BIC% at the buccal aspect of the implant and ISQ, but not on the lingual side. The study could not confirm any correlation between ISQ values and peak insertion torque data, nor between ISQ values and bone mineral density. A second study in cadavers performed by Gedrange et al. (2005) for the determination of the primary stability of orthodontic palatal implants stated a relationship between RF and BIC. Both Nkenke et al.

Table 3. Bone-to-implant contact percentage (BIC%)

Time (weeks)	BIC% (BS-SEM)				
	Mean	SD	Q25	Median	Q75
0	24.69	11.64	19.52	22.31	33.80
1	23.66	4.78	19.66	23.37	27.15
2	22.85	7.43	21.60	25.84	27.61
4	36.16	11.54	26.27	34.18	46.81
6	32.97	16.52	21.02	29.99	40.91
8	45.51	17.16	38.11	44.29	58.28

SD, standard deviation; BS-SEM, Backscattered scanning electron microscopy; Q25, quartile 1 (25%); Q75, quartile 3 (75%).

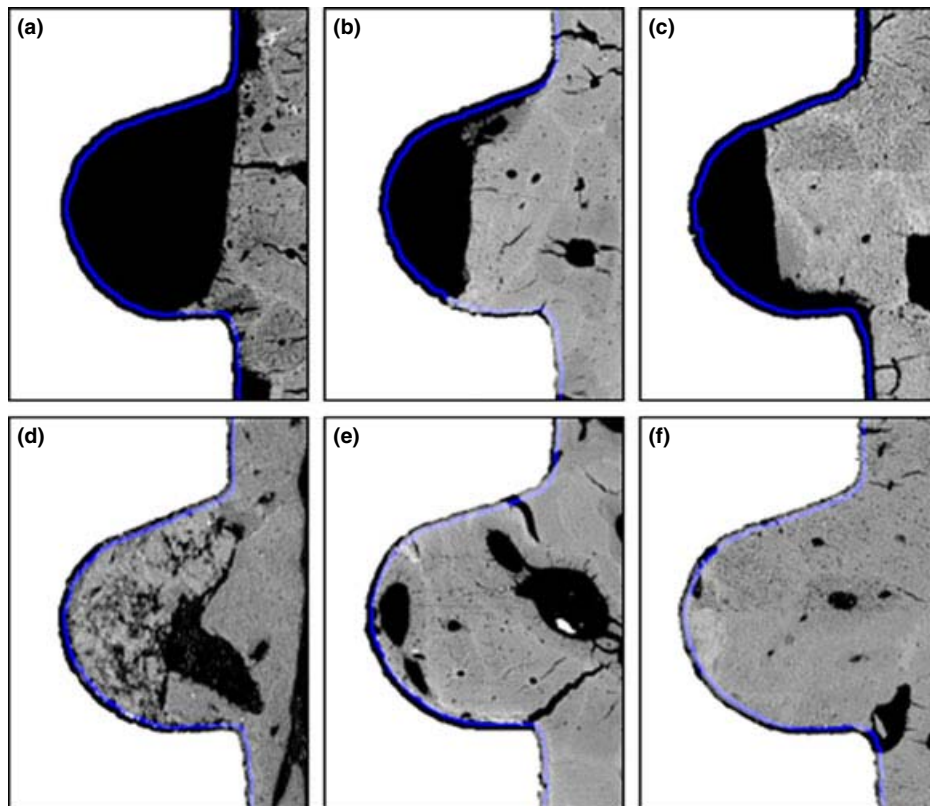


Fig. 5. Progression of bone-to-implant contact. Detail of six spires at 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 6 (e) and 8 (f) weeks, respectively. Implants are shown in white, bone in greys and the line where BIC was measured is coloured blue. The thickness of the line has been enlarged for imaging purposes. Note how the blue line increases the overlap with bone along time due to the increase in the bone filling up the spire. All images are at the same scale.

(2003) and Gedrange et al. (2005) found a positive correlation between the height of the crestal cortical bone and ISQ. An experiment in three human cadavers to evaluate the initial stability parameters (insertion torque value, ISQ and Periotest value) of implants inserted just after tooth extraction and to examine the relationship between initial stability parameters and BIC was undertaken by Jun et al. (2010). The initial stability parameters showed statistically significant correlation between each other, but no correlation was found between BIC and the initial stability parameters. In one of the two studies on patients, a statistically significant correlation has been reported (Scarano et al. 2006) between ISQ and BIC in a retrospective histological and

histomorphometrical study of seven titanium implants retrieved from humans. However, no significant correlation was found between BVD or bone trabecular connectivity (BTC) measurements and ISQ values in a study on humans jawbone characteristics (Huwiler et al. 2007). Curiously, in this study, no predictive value for losing implant stability was given to RFA, because the decrease in the value occurred after the fact.

Several animal experiments have been reported, also with different outcomes. A study in rabbits (Meredith et al. 1997b) failed to find a correlation between the degree of BIC and RFA measurements, although a strong correlation was observed between RF values and the EIL. Schliephake et al. (2006) could

not find any correlation between BIC% and ISQ values of 80 implants in 10 foxhounds after healing periods of 1 or 3 months. In a study, (Zhou et al. 2008) using two methods (bone scintigraphy and RFA) to evaluate the osseointegration ability in 30 rabbits, it was found that bone scintigraphy was more sensitive to the change of peri-implant bone than the digital radiographic examination, but it did not correlate with histomorphometrical data (BIC). However, it was found that RFA increased with the bone-to-implant contact during the healing phase and correlated with the histomorphometrical data. Ito et al. (2008) performed an experiment where 24 implants placed in the tibia of four mini-pigs were analysed with RF and histology after 1, 2 and 4 weeks. Although the correlation between RF and BIC, which was measured all around the implant, was not significant ($r = 0.221$), the correlation coefficient increased ($r = 0.361$) when BIC was measured at the neck of the implant. The study conducted by Abrahamsen et al. (2009) to evaluate the relationship between BIC and ISQ values during a 12-week healing period, in a beagle animal model experiment, did not find any correlation between the two parameters. Also, no correlation was found in the same experiment between ISQ values and bone density. However, studying the influence on early osseointegration of dental implants installed in rabbits with two different drilling protocols, Blanco et al. (2011) did find a positive correlation between the increase in ISQ values and BIC. On the other hand, in an experimental pilot study in sheep, aimed at comparing the early-term osseointegration characteristics of standard (SLA) and modified sand-blasted and acid-etched (modSLA) implants, no correlation was found between RFA and BIC (Abdel-Haq et al. 2011). A weak correlation between RFA and BIC was observed by Stadlinger et al. (2009 and 2012) using experimental coated (collagen and glycosaminoglycans) implants placed in the mandibles of 20 mini-pigs. Finally, a study conducted by Antunes et al. (2013) showed correlation between RFA versus BIC using deproteinized bovine bone mineral as grafting material to promote osseointegration and stability in implants placed in dog mandible bone defects.

In the current experiment, the correlation between RFA and BIC was investigated during healing periods of up to 8 weeks. RFA analysis was performed with an Osstell Mentor® magnetic device. A new standardized non-subjective and highly discriminative method was used for the determination of BIC data, based on BS-SEM images (Manresa et al. 2013).

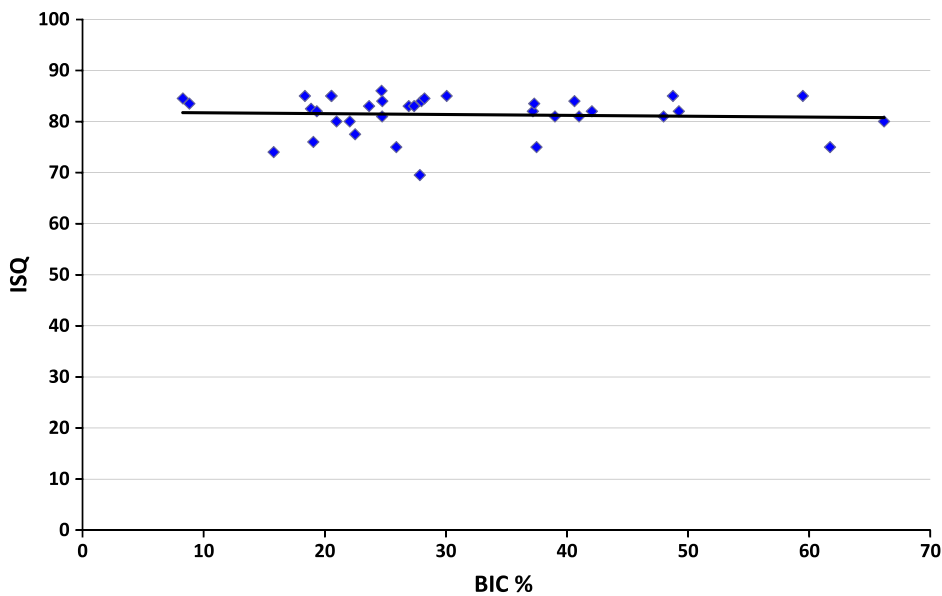


Fig. 6. Correlation of ISQ and BIC% values.

Implants with a SBM (sandblasting with soluble particles) surface was used in this experiment because the evidence from histomorphometrical data and clinical studies suggests that rough implant surfaces exert a clinically significant influence on faster osseointegration (Cochran et al. 1998; Berglundh et al. 2003; Abrahamsson et al. 2004; Buser et al. 2004; Tavares et al. 2007). Implant surface parameters are supposed to stimulate the bone cell reaction, resulting in an enhanced healing response and improved BIC.

Resonance frequency values as assessed by the Osstell Mentor® device are depicted in Fig. 3 and Table 2. The analysis of the data revealed a similar evolution of the ISQ values to that reported in previous animal experiments (Glauser et al. 2004; Al-Nawas et al. 2006) and clinical studies on patients (Nedir et al. 2004; Balshi et al. 2005; Boronat-López et al. 2006; Huwiler et al. 2007). At implant installation, the ISQ was 80.91 (medium data), decreasing the first week of healing to 79.75. This was followed by a period (from week 2 to 6) of increasing values. And at week eight, the ISQ had almost returned to the initial value (81.08).

Bone-to-implant contact measurement values obtained by the BS-SEM methodology are depicted in Fig. 4 and Table 3. The results obtained with this methodology of image acquisition, processing and analysis showed an evolution along time very similar to that obtained by other authors in comparable studies (Klongnoi et al. 2006; Tavares et al. 2007; Abrahamsson et al. 2009; Ballo et al. 2009; Calvo-Guirado et al. 2011; Santis et al. 2011).

The analysis of the data revealed that only minor changes of RF values (ISQ) occurred during healing periods of up to 8 weeks. However, the BIC% (mean values) experimented a small decrease until week 2, after which it increased significantly until the last evaluated period (week 8). In the present study, we did not find a positive correlation between the increase in ISQ values and BIC (Spearman correlation coefficient = -0.083 , Fig. 6). However, given that there is just one dog for healing period, this study could be considered as mainly descriptive in nature. Our results parallel previous findings of the above studies, which also failed to correlate RFA with histomorphometrical parameters (Schliephake et al. 2006; Ito et al. 2008; Zhou et al. 2008; Abrahamsson et al. 2009; Jun et al. 2010; Abdel-Haq et al. 2011).

In several clinical studies (Frigberg et al. 1999; Becker et al. 2005), it has been stated that all implants, irrespective of their initial stability, tend to reach a similar level of stability. These results are supported by another study in rabbits (Andersson et al. 2008) which found that implants in soft bone with low primary stability showed a marked increase in stability compared with implants in dense bone. On the other hand, in the rabbit experiment by Meredith et al. (1997b), RF increased with time as a function of an increased stiffness, resulting from new bone formation and remodelling. Taking these observations into account, an explanation of the lack of correlation between BIC and RFA measurements, both in our experiment and others with similar outcomes, could be that the degree of bone contact does not necessarily reflect the

stiffness of the surrounding bone. In fact, in moderately rough implants, as used in this study (SBM, sandblasting soluble particles), their surface is often covered by a thin layer of bone, which is probably not determinant for the biomechanical support of implants. According to Ito et al. (2008), RFA with Osstell® measures stiffness, which is a combination of bone-implant contact and bone density around the implant. Considering this point, it is not surprising that RF does not correspond with histological implant-bone contact.

On the other hand, it has been hypothesized that the inconsistency in the previously reported correlation between ISQ and BIC could be due to the fact that implant stability and BIC% were measured after several weeks or even months of osseointegration, when the interface in the BIC area may become completely bounded. This is because in some studies, the initial stability of implants, which is crucial to the osseointegration ability, was not assessed (Huang et al. 2012).

Very recently, Hsu et al. (2013) found in artificial bone studies (Huang et al. 2012) that the initial implant stability as measured by RFA was strongly positively correlated with the 3-dimensional 3D BIC% assessed by high-resolution microcomputed tomography. Taking into account that this correlation was not found using the 2D BIC%, the authors stated that 3D BIC% should be more representative than the 2D BIC%, as only one or a few histological sections from 2D BIC, cannot represent the entire 3D BIC between the implant and bone (Ito et al. 2008; Liu et al. 2012). However, these studies are of limited value due to the use of synthetic bone models to mimic the advanced cellular structure of bone. As real bone may exhibit more complex biological properties than the synthetic bone, more research needs to be carried out to elucidate how primary implant stability is affected by the 3D BIC%.

Conclusions

The present experiment in beagle dog mandible failed to identify correlations between the histomorphometrical parameter of osseointegration BIC and ISQ values. This finding of an absence of relationship between these two parameters is in agreement with several previous studies in human and experimental animals.

Acknowledgements: The generous support of this research project by Biohorizons Inc. is gratefully acknowledged.

References

- Abdel-Haq, J., Karabuda, C.Z., Arisan, V., Mutlu, Z. & K urkc u, M. (2011) Osseointegration and stability of a modified sand-blasted acid-etched implant: an experimental pilot study in sheep. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 265–274.
- Abrahamsson, I., Berglundh, T., Linder, E., Lang, N.P. & Lindhe, J. (2004) Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 381–392.
- Abrahamsson, I., Linder, E. & Lang, N.P. (2009) Implant stability in relation to osseointegration: an experimental study in the Labrador dog. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 313–318.
- Al-Nawas, B., Wagner, W. & Gr tzt, K.A. (2006) Insertion torque and resonance frequency analysis of dental implant systems in an animal model with loaded implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **21**: 726–732.
- Andersson, P., Verrocchi, D., Viinama'ki, R. & Sennerby, L. (2008) A one-year clinical, radiographic and RFA study of Neoss implants. *Applied Osseointegration Research* **6**: 23–26.
- Antunes, A.A., Oliveira Neto, P., De Santis, E., Caneva, M., Botticelli, D. & Salata, L. (2013) Comparisons between bio-oss[®] and straumann[®] bone ceramic in immediate and staged implant placement in dogs mandible bone defects. *Clinical Oral Implants Research* **24**: 135–142.
- Aparicio, C. (1997) The use of the periotest value as the initial success criteria of an implant: 8-year report. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **17**: 151–161.
- Aparicio, C., Lang, N.P. & Rangert, B. (2006) Validity and clinical significance of biomechanical testing of implant/bone interface. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 2–7.
- Atsumi, M., Park, S.H. & Wang, H.L. (2007) Methods used to assess implant stability: current status. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **22**: 743–754.
- Ballo, A.M., Akca, E.A., Ozen, T., Lassila, L., Vallittu, P.K. & N rhi, T.O. (2009) Bone tissue responses to glass fiber-reinforced composite implants. A histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 608–615.
- Balshi, S.F., Allen, F.D., Wolfinger, G.J. & Balshi, T.J. (2005) A resonance frequency analysis assessment of maxillary and mandibular immediately loaded implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **20**: 584–594.
- Becker, W., Sennerby, L., Bedrossian, E., Becker, B.E. & Lucchini, J.P. (2005) Implant stability measurements for implants placed at the time of extraction: a cohort, prospective clinical trial. *Journal of Periodontology* **76**: 391–397.
- Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P. & Lindhe, J. (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants: a model study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 251–262.
- Berglundh, T. & Stavropoulos, A. (2012) Preclinical *in vivo* research in implant dentistry. Consensus of the eighth European workshop on periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **39**: 1–5.
- Blanco, J., Alvarez, E., Muñoz, F., Li ares, A. & Cantalapiedra, A. (2011) Influence on early osseointegration of dental implants installed with two different drilling protocols: a histomorphometric study in rabbit. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 92–99.
- Boronat-López, A., Pe arocha-Diago, M., Martínez-Cortisoz, O. & M nguez-Martínez, I. (2006) Resonance frequency analysis after the placement of 133 dental implants. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* **11**: E272–E276.
- Buser, D., Broggin, N., Wieland, M., Schenk, R.K., Denzer, A.J., Cochran, D.L., Hoffmann, B., Lussi, A. & Steinemann, S.G. (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal of Dental Research* **83**: 529–533.
- Calvo-Guirado, J.L., Mate-Sanchez, J., Delgado-Ruiz, R., Ramirez-Fern andez, M.P., Cutando-Soriano, A. & Peña, M. (2011) Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 587–593.
- Chiapasco, M., Gatti, C., Rossi, E., Haefliger, W. & Markwalder, T.H. (1997) Implant-retained mandibular overdentures with immediate loading. A retrospective multicenter study on 226 consecutive cases. *Clinical Oral Implants Research* **8**: 48–57.
- Cochran, D.L., Schenk, R.K., Lussi, A., Higginbottom, F.L. & Buser, D. (1998) Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *Journal of Biomedical Materials Research* **40**: 1–11.
- Donath, K. (1985) The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue (sage-schliff [sawing and grinding] technique). *Pathology Research and Practice* **179**: 631–633.
- Donath, K. & Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The sage-schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology* **11**: 318–326.
- Franch, J., Pastor, J., Franch, B., Durall, I., Manzanares, M.C. & Feline, J. (2000) Back-scattered electron imaging of a non-vertebral case of hypervitaminosis A in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery* **2**: 49–56.
- Friberg, B., Sennerby, L., Meredith, N. & Lekholm, U. (1999) A comparison between cutting torque and resonance frequency measurements of maxillary implants: a 20-month clinical study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **28**: 297–303.
- Gedrange, T., Hietschold, V., Mai, R., Wolf, P., Nicklisch, M. & Harzer, W. (2005) An evaluation of resonance frequency analysis for the determination of the primary stability of orthodontic palatal implants. A study in human cadavers. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 425–431.
- Glauser, R., Sennerby, L., Meredith, N., R e, A., Lundgren, A., Gottlow, J. & H mmerle, C.H.F. (2004) Resonance frequency analysis of implants subjected to immediate or early functional occlusal loading. Successful vs. failing implants. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 428–434.
- Hsu, J.T., Huang, H.L., Tsai, M.T., Wu, A.Y.J., Tu, M.G. & Fuh, L.J. (2013) Effects of the 3D bone-to-implant contact and bone stiffness on the initial stability of a dental implant: micro-CT and resonance frequency analyses. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **42**: 276–280.
- Huang, H.M., Lee, S.Y., Yeh, C.Y. & Lin, C.T. (2002) Resonance frequency assessment of dental implant stability with various bone qualities: a numerical approach. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 65–74.
- Huang, H.L., Tsai, M.T., Su, K.C., Li, Y.F., Hsu, J.T., Chang, C.H., Fuh, L.J. & Wu, A.Y.J. (2012) Relation between initial implant stability quotient and bone-implant contact percentage: an *in vitro* model study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* doi: 10.1016/j.oooo.2012.01.037. (in press).
- Huwiler, M.A., Pjetursson, B.E., Bosshardt, D.D., Salvi, G.E. & Lang, N.P. (2007) Resonance frequency analysis in relation to jawbone characteristics and during early healing of implant installation. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 275–280.
- Isidor, F. (1998) Mobility assessment with the periotest system in relation to histologic findings of oral implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **13**: 377–383.
- Ito, Y., Sato, D., Yoneda, S., Ito, D., Kondo, H. & Kasugai, S. (2008) Relevance of resonance frequency analysis to evaluate dental implant stability: simulation and histomorphometrical animal experiments. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 9–14.
- Jaffin, R.A. & Berman, C.L. (1991) The excessive loss of branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *Journal of Periodontology* **62**: 2–4.
- Jun, S.H., Chang, B.M., Weber, H.P. & Kwon, J.J. (2010) Comparison of initial stability parameters and histomorphometric analysis of implants inserted into extraction sockets: human fresh cadaver study. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **25**: 985–990.
- Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M. & Altman, D.G. (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* **1**: 94–99.
- Klongnoi, B., Rupprecht, S., Kessler, P., Thorwarth, M., Wiltfang, J. & Schlegel, K.A. (2006) Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation: an explorative study. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 312–320.
- Lazzara, R.J., Porter, S.S., Testori, T., Galant, J. & Zetterqvist, L. (1998) A prospective multicenter study evaluating loading of osseotite implants two months after placement: one-year results. *Journal of Esthetic Dentistry* **10**: 280–289.
- Lioubavina-Hack, N., Lang, N.P. & Karring, T. (2006) Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 244–250.

- Liu, C., Tsai, M.-T., Huang, H.-L., Chen, M.Y.-C., Hsu, J.T., Su, K.-C., Chang, C.-H. & Wu, A.Y.-J. (2012) Relation between insertion torque and bone-implant contact percentage: an artificial bone study. *Clinical Oral Investigations* **16**: 1679–1684.
- Manresa, C., Bosch, M., Manzanares, M.C., Carvalho, P. & Echeverría, J.J. (2013) A new standardized-automatic method for Bone-to-Implant-Contact histomorphometric analysis base on Backscattered Scanning Electron Microscopy images. *Clinical Oral Implants Research* doi: 10.1111/clr.12129 (in press).
- Martinez, H., Davarpanah, M., Missika, P., Celletti, R. & Lazzara, R. (2001) Optimal implant stabilization in low density bone. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 423–432.
- Meredith, N. (1998a) Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *The International Journal of Prosthodontics* **11**: 491–501.
- Meredith, N. (1998b) A review of nondestructive test methods and their application to measure the stability and osseointegration of bone anchored endosseous implants. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* **26**: 275–291.
- Meredith, N., Alleyne, D. & Cawley, P. (1996) Quantitative determination of the stability of the implant-tissue interface using resonance frequency analysis. *Clinical Oral Implants Research* **7**: 261–267.
- Meredith, N., Book, K., Friberg, B., Jemt, T. & Sennerby, L. (1997a) Resonance frequency measurements of implant stability *in vivo*: a cross-sectional and longitudinal study of resonance frequency measurements on implants in the edentulous and partially dentate maxilla. *Clinical Oral Implants Research* **8**: 226–233.
- Meredith, N., Shagaldi, F., Alleyne, D., Sennerby, L. & Cawley, P. (1997b) The application of resonance frequency measurements to study the stability of titanium implants during healing in the rabbit tibia. *Clinical Oral Implants Research* **8**: 234–243.
- Nedir, R., Bischof, M., Szmukler-Moncler, S., Bernard, J. & Samson, J. (2004) Predicting osseointegration by means of implant primary stability: a resonance-frequency analysis study with delayed and immediately loaded ITI SLA implants. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 520–528.
- Nkenke, E., Hahn, M., Weinzierl, K., Radespiel-Tröger, M., Neukam, F.W. & Engelke, K. (2003) Implant stability and histomorphometry: a correlation study in human cadavers using stepped cylinder implants. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 601–609.
- Preibisch, S., Saalfeld, S. & Tomancak, P. (2009) Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* **25**: 1463–1465.
- Santis, E.D., Botticelli, D., Pantani, F., Pereira, F.P., Beolchini, M. & Lang, N.P. (2011) Bone regeneration at implants placed into extraction sockets of maxillary incisors in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 430–437.
- Scarano, A., Degidi, M., Iezzi, G., Petrone, G. & Piattelli, A. (2006) Correlation between implant stability quotient and bone-implant contact: a retrospective histological and histomorphometrical study of seven titanium implants retrieved from humans. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **8**: 218–222.
- Schliephake, H., Donnerstag, F., Berten, J.L. & Lönquist, N. (2006) Palate morphology after unilateral and bilateral cleft lip and palate closure. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **35**: 25–30.
- Schulte, W. & Lukas, D. (1993) Periotest to monitor osseointegration and to check the occlusion in oral implantology. *The Journal of Oral Implantology* **19**: 23–32.
- Sennerby, L. & Meredith, N. (2008) Implant stability measurements using resonance frequency analysis: biological and biomechanical aspects and clinical implications. *Periodontology 2000* **47**: 51–66.
- Sennerby, L., Persson, L.G., Berglundh, T., Wennerberg, A. & Lindhe, J. (2005) Implant stability during initiation and resolution of experimental peri-implantitis: an experimental study in the dog. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **7**: 136–140.
- Sjöström, M., Lundgren, S., Nilson, H. & Sennerby, L. (2005) Monitoring of implant stability in grafted bone using resonance frequency analysis. A clinical study from implant placement to 6 months of loading. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **34**: 45–51.
- Stadlinger, B., Bierbaum, S., Grimmer, S., Schulz, M.C., Kuhlisch, E., Scharnweber, D., Eckelt, U. & Mai, R. (2009) Increased bone formation around coated implants. *Journal of Clinical Periodontology* **36**: 698–704.
- Stadlinger, B., Hintze, V., Bierbaum, S., Möller, S., Schulz, M.C., Mai, R., Kuhlisch, E., Heinemann, S., Scharnweber, D., Schnabelrauch, M. & Eckelt, U. (2012) Biological functionalization of dental implants with collagen and glycosaminoglycans—A comparative study. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **100B**: 331–341.
- Szmukler-Moncler, S., Salama, H., Reingewirtz, Y. & Dubruille, J.H. (1998) Timing of loading and effect of micromotion on bone-dental implant interface: review of experimental literature. *Journal of Biomedical Materials Research* **43**: 192–203.
- Tavares, M.G., Tambasco De Oliveira, P., Nanci, A., Hawthorne, A.C., Rosa, A.L. & Xavier, S.P. (2007) Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 452–458.
- Testori, T., Del Fabbro, M., Feldman, S., Vincenzi, G., Sullivan, D., Rossi, R., Jr, Anitua, E., Bianchi, F., Francetti, L. & Weinstein, R.L. (2002) A multicenter prospective evaluation of 2-months loaded Osseotite® implants placed in the posterior jaws: 3-year follow-up results. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 154–161.
- Zhou, Y., Jiang, T., Qian, M., Zhang, X., Wang, J., Shi, B., Xia, H., Cheng, X. & Wang, Y. (2008) Roles of bone scintigraphy and resonance frequency analysis in evaluating osseointegration of endosseous implant. *Biomaterials* **29**: 461–474.
- Zix, J., Hug, S., Kessler-Liechti, G. & Mericske-Stern, R. (2008) Measurement of dental implant stability by resonance frequency analysis and damping capacity assessment: comparison of both techniques in a clinical trial. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **23**: 525–530.

BIBLIOGRAFÍA

Aballe, M., López Ruiz, J., Abadía, J. M., Adeva, P. (1996) *Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía por Rayos X*, 1ª edición. Madrid: Editorial Consejo Superior Investigaciones Científicas (CSIC), Editorial Rueda.

Abdel-Haq, J., Karabuda, C. Z., Arisan, V., Mutlu, Z., Kürkçü, M. (2011) Osseointegration and stability of a modified sand-blasted acid-etched implant: An experimental pilot study in sheep. *Clinical Oral Implant Research* **22**: 265-274.

Abrahamsson, I., Berglundh, T., Linder, E., Lang, N. P., Lindhe, J. (2004) Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. an experimental study in the dog. *Clinical Oral Implant Research* **15**: 381-392.

Abrahamsson, I., Linder, E., Lang, N. P. (2009) Implant stability in relation to osseointegration: An experimental study in the labrador dog. *Clinical Oral Implant Research* **20**: 313-318.

Aksoy, U., Eratalay, K. Tözüm, T. F. (2009) The Possible Association Among Bone Density Values, Resonance Frequency Measurements, Tactile Sense, and Histomorphometric Evaluations of Dental Implant Osteotomy Sites: A Preliminary Study. *Implant Dentistry* **18**: 316-325.

Al-Nawas, B., Götz, H. (2003a) Three-dimensional topographic and metrologic evaluation of dental implants by confocal laser scanning microscopy. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **5**: 176-183.

Al-Nawas, B., Götz, H., Grötz, K. A., Duschner, H. (2003b) Standardized characterization of peri-implant bone structure using confocal laser scanning microscopy (CLSM). *European Cells and Materials IV* **5**:53.

Al-Nawas, B., Wagner, W., Grötz, K. A. (2006) Insertion torque and resonance frequency analysis of dental implant systems in an animal model with loaded implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **21**: 726-732.

Al-Nawas, B., Groetz, K. A., Goetz, H., Duschner, H., Wagner, W. (2008) Comparative histomorphometry and resonance frequency analysis of implants with moderately rough surfaces in a loaded animal model. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 1-8.

Andersson, P., Verrocchi, D., Viinamaki, R., Sennerby, L. (2008) A one-year clinical, radiographic and RFA study of Neoss implants. *Applied Osseointegration Research* **6**: 23–26.

Andrés-García, R., García, N., Herrero, F., Fernández, A., Rios, V. (2009) In vitro evaluation of the influence of the cortical bone on the primary stability of two implant systems. *Medicina Oral Patología y Oral Cirujía Bucal* **14**: E93-E97.

Antunes, A. A., Oliveira Neto, P., De Santis, E., Caneva, M., Botticelli, D., Salata, L. (2013) A Comparisons between bio-oss® and straumann® bone ceramic in immediate and staged implant placement in dogs mandible bone defects. *Clinical Oral Implant Research* **24**: 135-142.

Bibliografía

- Aparicio, C. (1997) The use of the periotest value as the initial success criteria of an implant: 8-year report. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **17**: 151-161.
- Astrand, P., Ahlqvist, J., Gunne, J., Nilson, H. (2008) Implant treatment of patients with edentulous jaws: a 20-year follow-up. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **10**: 207-217.
- Atsumi, M., Park, S. H., Wang, H. L. (2007) Methods used to assess implant stability: Current status. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **22**: 743-754.
- Ballo, A. M., Akca, E. A., Ozen, T., Lassila, L., Vallittu, P. K., Närhi, T. O. (2009) Bone tissue responses to glass fiber-reinforced composite implants - A histomorphometric study. *Clinical Oral Implant Research* **20**: 608-615.
- Balshi, S. F., Allen, F. D., Wolfinger, G. J., Balshi, T. J. (2005) A resonance frequency analysis assessment of maxillary and mandibular immediately loaded implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **20**: 584-594.
- Becker, W., Sennerby, L., Bedrossian, E., Becker, B.E., Lucchini, J.P. (2005) Implant stability measurements for implants placed at the time of extraction: a cohort, prospective clinical trial. *Journal of Periodontology* **76**: 391-397.
- Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N. P., Lindhe, J. (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants: A model study in the dog. *Clinical Oral Implant Research* **14**: 251-262.
- Berglundh, T., Stavropoulos, A. (2012) Preclinical in vivo research in implant dentistry. consensus of the eighth european workshop on periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **39**: 1-5.
- Bischof, M., Nedir, R., Szmukler-Moncler, S., Bernard, J.-P., Samson, J. (2004) Implant stability measurement of delayed and immediately loaded implants during healing. A clinical resonance-frequency analysis study with sandblasted-and-etched ITI implants. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 529-539
- Blanco, J., Alvarez, E., Muñoz, F., Liñares, A., Cantalapiedra, A. (2011) Influence on early osseointegration of dental implants installed with two different drilling protocols: A histomorphometric study in rabbit. *Clinical Oral Implant Research* **22**: 92-99.
- Boronat-López, A., Peñarrocha-Diago, M., Martínez-Cortissoz, O., Mínguez-Martínez, I. (2006) Resonance frequency analysis after the placement of 133 dental implants. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* **11**: E272-276.
- Buser, D., Broggini, N., Wieland, M., Schenk, R. K., Denzer, A. J., Cochran, D. L., Hoffmann, B., Lussi, A., Steinemann, S. G. (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal of Dental Research* **83**: 529-533.
- Calvo-Guirado, J. L., Mate-Sanchez, J., Delgado-Ruiz, R., Ramirez-Fernández, M. P., Cutando-Soriano, A., Peña, M. (2011) Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: A dog study. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 587-593.

- Calvo-Guirado, J. L., Aguilar-Salvatierra, A., Guardia, J., Delgado-Ruiz, R., Ramírez-Fernández, M. P., Pérez Sánchez, C., Gómez-Moreno, G. (2012) Evaluation of periimplant bone neoformation using different scanning electron microscope methods for measuring BIC. A dog study. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. **4**: e8-13.
- Cavit, M., Karasoy, D., Akca, K., & Eckert, S. E. (2009) Meta-analysis of methods used to assess implant stability. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **24**: 2015-2032.
- Chiapasco, M., Gatti, C., Rossi, E., Haefliger, W., Markwalder, T. H. (1997) Implant-retained mandibular overdentures with immediate loading. A retrospective multicenter study on 226 consecutive cases. *Clinical Oral Implant Research* **8**: 48-57.
- Cochran, D. L., Schenk, R. K., Lussi, A., Higginbottom, F. L., Buser, D. (1998) Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible. *Journal of Biomedical Materials Research* **40**: 1-11.
- Conchello, J.-A. & Lichtman, J. W. (2005) *Optical sectioning microscopy*. *Nature Methods* **2**: 920 - 931.
- Chang, C. -S., Lee, T. -M., Chang, C. -H., Liu, J. -K. (2009) The effect of microrough surface treatment on miniscrews used as orthodontic anchors. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 1178-1184.
- Coelho, P. G., Marin, C., Granato, R., Giro, G., Suzuki, M., Bonfante, E. A. (2012) Biomechanical and histologic evaluation of non-washed resorbable blasting media and alumina-blasted/acid-etched surfaces. *Clinical Oral Implants Research* **23**: 132-135.
- Degidi, M., Perrotti, V., Piattelli, A., Iezzi, G. (2010) Mineralized bone-implant contact and implant stability quotient in 16 human implants retrieved after early healing periods: A histologic and histomorphometric evaluation. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **25**: 45-48
- De Smet, E., Duyck, J., Vander Sloten, J., Jacobs, R., Naert, I. (2007) Timing of loading; immediate, early, or delayed; in the outcome of implants in the edentulous mandible: a prospective clinical trial. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* **22**: 580-94.
- Donath, K. (1985) The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue [sage-schliff (sawing and grinding) technique]. *Pathology Research and Practice* **179**: 631-633.
- Donath, K., Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. the sage-schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology* **11**: 318-326.
- Ekelund, J.A., Lindquist, L.W., Carlsson, G. E., Jemt, T. (2003) Implant treatment in the edentulous mandible: a prospective study on Brånemark system implants over more than 20 years. *International Journal of Prosthodontics* **16**: 602-608.

Bibliografia

- Engquist, B., Astrand, P., Anzén, B., Dahlgren, S., Engquist, E., Feldmann, H., Karlsson, U., Nord, P.G., Sahlholm, S., Svärdström, P. (2005) Simplified methods of implant treatment in the edentulous lower jaw: a 3-year follow-up report of a controlled prospective study of one-stage versus two-stage surgery and early loading. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **7**: 95-104.
- Fischer, K., Bäckström, M., Sennerby, L. (2009) Immediate and early loading of oxidized tapered implants in the partially edentulous maxilla: a 1-year prospective clinical, radiographic, and resonance frequency analysis study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **11**: 69-80.
- Fontana, F., Rocchietta, I., Addis, A., Schupbach, P., Zanotti, G., Simion, M. (2011) Effects of a calcium phosphate coating on the osseointegration of endosseous implants in a rabbit model. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 760-766.
- Franch, J., Pastor, J., Franch, B., Durall, I., Manzanares, M. C., Feline, J. (2000) Back-scattered electron imaging of a non-vertebral case of hypervitaminosis A in a cat. *Medical Surgery* **2**:49-56.
- Friberg, B., Sennerby, L., Meredith, N., Lekholm, U. (1999) A comparison between cutting torque and resonance frequency measurements of maxillary implants: A 20-month clinical study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **28**: 297-303.
- Gedrange, T., Hietschold, V., Mai, R., Wolf, P., Nicklisch, M., Harzer, W. (2005) An evaluation of resonance frequency analysis for the determination of the primary stability of orthodontic palatal implants. A study in human cadavers. *Clinical Oral Implant Research* **16**: 425-431.
- Glauser, R., Sennerby, L., Meredith, N., Rée, A., Lundgren, A., Gottlow, J., Hämmerle, C. H. F. (2004) Resonance frequency analysis of implants subjected to immediate or early functional occlusal loading. successful vs. failing implants. *Clinical Oral Implant Research* **15**: 428-434.
- Goldstein, J., Newbury, D. E., Joy, D. C., Echlin, P., Roming, A. D., Lymanm, C. E., Fiori, C., Lifshin, E. (2005). In: Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Grötz, K. A., Piepkorn, B., Al-Nawas, B., Duschner, H., Bittinger, F., Kann, P., Beyer, J., Wagner, W. (1999) Confocal laser scanning microscopy: A nondestructive subsurface histotomography of healthy human bone. *Calcified Tissue International* **65**: 8-10.
- Hipp, J. A., Brunski, J. B., & Cochran, G. V. (1987) Method for histological preparation of bone sections containing titanium implants. *Stain Technology* **62**:247-252.
- Hsu, J. T., Huang, H. L., Tsai, M. T., Wu, A. Y. J., Tu, M. G., Fuh, L. J. (2013) Effects of the 3D bone-to-implant contact and bone stiffness on the initial stability of a dental implant: Micro-CT and resonance frequency analyses. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **42**: 276-280.

- Huang, H. M., Lee, S. Y., Yeh, C. Y., Lin, C. T. (2002) Resonance frequency assessment of dental implant stability with various bone qualities: A numerical approach. *Clinical Oral Implant Research* **13**: 65-74.
- Huang, H. L., Tsai, M. T., Su, K. C., Li, Y. F., Hsu, J. T., Chang, C. H., Fuh, L. J., & Wu, A. Y. J (2013) Relation between initial implant stability quotient and bone-implant contact percentage: An in vitro model study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* **116**: 356-361.
- Huwiler, M. A., Pjetursson, B. E., Bosshardt, D. D., Salvi, G. E., Lang, N. P. (2007) Resonance frequency analysis in relation to jawbone characteristics and during early healing of implant installation. *Clinical Oral Implant Research* **18**: 275-280.
- Isidor, F. (1998) Mobility assessment with the periotest system in relation to histologic findings of oral implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **13**: 377-383.
- Ito, Y., Sato, D., Yoneda, S., Ito, D., Kondo, H., Kasugai, S. (2008) Relevance of resonance frequency analysis to evaluate dental implant stability: Simulation and histomorphometrical animal experiments. *Clinical Oral Implant Research* **19**: 9-14.
- Ivannoff, J., Sennerby, L., Johansson, R. B., Lekholm, U. (1996) Influence of implant diameters on the integration of screw implants. An experimental study in rabbits. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **26**: 141-148.
- Jaffin, R. A., Berman, C. L. (1991) The excessive loss of branemark fixtures in type IV bone: A 5-year analysis. *Journal of Periodontology* **62**: 2-4.
- Jemt, T., Johansson, J. (2006) Implant treatment in the edentulous maxillae: a 15-year follow-up study on 76 consecutive patients provided with fixed prostheses. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **8**: 61-69.
- Jeong, R., Marin, C., Granato, R., Suzuki, M., Gil, J. N., Granjeiro, J. M., Coelho, P. G. (2010) Early bone healing around implant surfaces treated with variations in the resorbable blasting media method. A study in rabbits. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* **15**: 119-125.
- Johansson, C. B., Morberg, P. (1995a) Importance of ground section thickness for reliable histomorphometrical results. *Biomaterials* **16**:91-95.
- Johansson, C. B., Morberg, P. (1995b) Cutting directions of bone with biomaterials in situ does influence the outcome of histomorphometrical quantifications. *Biomaterials* **16**:1037-1039.
- Johansson, C. B., Gretzer, C., Jimbo, R., Mattisson, I., Ahlberg, E. (2011) Enhanced implant integration with hierarchically structured implants: A pilot study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **23**: 943-953.

Bibliografia

- Jun, S. H., Chang, B. M., Weber, H. P., Kwon, J. J. (2010) Comparison of initial stability parameters and histomorphometric analysis of implants inserted into extraction sockets: Human fresh cadaver study. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **25**: 985-990.
- Kelly, J., Lin, A., Wang, C. J., Park, S., Nishimura, I. (2009) Vitamin D and bone physiology: Demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model. *Journal of Prosthodontics* **18**: 473-478.
- Kihara, A., Morimoto, K., Suetsugu, T. (1989) Improved method using a bubble-free adhesion technique for the preparation of semi-serial undecalcified histologic sections containing dental implants. *Journal of Oral Implantology* **15**: 87-94.
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., Altman, D. G. (2010) Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J. Pharmacol. Pharmacother* **1**: 94-99.
- Klongnoi, B., Rupprecht, S., Kessler, P., Thorwarth, M., Wiltfang, J., Schlegel, K. A. (2006) Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation: An explorative study. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 312-320.
- Koch, G. Paquette, D. (1997) Design principles and statistical considerations in periodontal clinical trials. *Annals of Periodontology* **2**: 42-63.
- Lachmann, S., Jäger, B., Axmann, D., Gomez-Roman, G., Groten, M., Weber, H. (2006a) Resonance frequency analysis and damping capacity assessment. Part 1: An in vitro study on measurement reliability and a method of comparison in the determination of primary dental implant stability. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 75-79.
- Lachmann, S., Laval, Y., Jäger, B., Axmann, D., Gomez-Roman, G., Groten, M., Weber, H. (2006b) Resonance frequency analysis and damping capacity assessment. Part 2: Peri-implant bone loss follow-up. An in vitro study with the Periotest™ and Osstell™ instruments. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 80-84.
- Lazzara, R. J., Porter, S. S., Testori, T., Galant, J., Zetterqvist, L. (1998) A prospective multicenter study evaluating loading of osseotite implants two months after placement: One-year results. *Journal of Esthetic Dentistry (Canada)* **10**: 280-289.
- Lee, J, Sieweke J. H., Rodriguez, N. A., Schupbach, P., Lindstrom, H., Susin C, Wikesjö, U. M. (2009) Evaluation of nano-technology-modified zirconia oral implants: a study in rabbits. *Journal of Clinical Periodontology* **36**: 610-617.
- Lekholm, U., Gröndahl, K., Jemt, T. (2006) Outcome of oral implant treatment in partially edentulous jaws followed 20 years in clinical function. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **8**:178-186.
- Lesmes, D., Laster, Z. (2011) Innovations in dental implant design for current therapy. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* **23**: 193-200.

- Lindquist, L. W, Carlsson, G. E., Jemt, T. (1996) A prospective 15-year follow up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clinical Oral Implants Research* **7**: 329–336.
- Lioubavina-Hack, N., Lang, N. P., Karring, T. (2006) Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Clinical Oral Implant Research* **17**: 244-250.
- Liu, C., Tsai, M.-T., Huang, H.-L., Chen, M. Y.-C., Hsu, J. T., Su, K.-C., Chang, C.-H., Wu, A. Y.-J (2012). Relation between insertion torque and bone-implant contact percentage: an artificial bone study. *Clinical Oral Investigation* **16**: 1679-1684.
- López-López, J., Chimenos-Küstner, E., Manzanares-Cespedes, M. C., Muñoz-Sánchez, J., Castañeda-Vega, P., Jané-Salas, E., Alvarez-López, J. M., Gimeno-Sanding, A. (2009) Histomorphological study of the bone regeneration capacity of platelet-rich plasma, bone marrow and tricalcium phosphate: Experimental study on pigs. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. **14**: 620-7.
- Marin, C., Granato, R., Suzuki, M., Gil, J. N., Piattelli, A., Coelho, P. G. (2008) Removal torque and histomorphometric evaluation of bioceramic grit-blasted/acid-etched and dual acid-etched implant surfaces: An experimental study in dogs. *Journal of Periodontology* **79**: 1942-1949.
- Manresa, C., Bosch, M., Manzanares, M. C., Carvalho, P., Echeverría, J. J. (2013a) A new standardized-automatic method for Bone-to-Implant-Contact histomorphometric analysis base on Backscattered Scanning Electron Microscopy images. *Clinical Oral Implant Research* **xx**: xx-xx (doi: 10.1111/clr.12129).
- Manresa, C., Bosch, M., Echeverría, J. J. (2013b) The comparison between implant stability quotient and bone-implant contact revisited: an experiment in Beagle dog. *Clinical Oral Implant Research* **xx**: xx-xx (doi: 10.1111/clr.12256).
- Martinez, H., Davarpanah, M., Missika, P., Celletti, R., Lazzara, R. (2001) Optimal implant stabilization in low density bone. *Clinical Oral Implant Research* **12**: 423-432.
- McMillan, P. J., Riggs, M. L., Bogle, G. C., Crigger, M. (2000) Variables that influence the relationship between osseointegration and bone adjacent to an implant. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **15**: 654-661.
- Meredith, N. (1998a) Assessment of implant stability as a prognostic determinant. *International Journal of Prosthodontics* **11**: 491-501.
- Meredith, N. (1998b) A review of nondestructive test methods and their application to measure the stability and osseointegration of bone anchored endosseous implants. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* **26**: 275-291.
- Meredith, N., Alleyne, D., Cawley, P. (1996) Quantitative determination of the stability of the implant-tissue interface using resonance frequency analysis. *Clinical Oral Implant Research* **7**: 261-267.

Bibliografía

Meredith, N., Book, K., Friberg, B., Jemt, T., Sennerby, L. (1997a) Resonance frequency measurements of implant stability in vivo: A cross-sectional and longitudinal study of resonance frequency measurements on implants in the edentulous and partially dentate maxilla. *Clinical Oral Implant Research* **8**: 226-233.

Meredith, N., Shagaldi, F., Alleyne, D., Sennerby, L., Cawley, P. (1997b) The application of resonance frequency measurements to study the stability of titanium implants during healing in the rabbit tibia. *Clinical Oral Implant Research* **8**: 234-243.

Myers, J. L.; Well, A. D. (2003), *Research Design and Statistical Analysis*, 2ª edición, p. 508. Mahwah, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.

Nedir, R., Bischof, M., Szmukler-Moncler, S., Bernard, J., Samson, J. (2004) Predicting osseointegration by means of implant primary stability: A resonance-frequency analysis study with delayed and immediately loaded ITI SLA implants. *Clinical Oral Implant Research* **15**: 520-528.

Nkenke, E., Hahn, M., Weinzierl, K., Radespiel-Tröger, M., Neukam, F. W., Engelke, K. (2003) Implant stability and histomorphometry: A correlation study in human cadavers using stepped cylinder implants. *Clinical Oral Implant Research* **14**: 601-609.

Norman, C.A. (2007) Oral implantology. Glossary of implant terms. *The Journal of Oral Implantology* **suppl 1**: 2-14.

Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F. H., Anderson, R. R., Schwarzenberger, K., Young, R. C. (2012) Introduction to Confocal Microscopy. *Journal of Investigative Dermatology* **132**: 1-5

Orsini, G., Piattelli, M., Scarano, A., Petrone, G., Kenealy, J., Piattelli, A., Caputi, S. (2007) Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *Journal of Periodontology* **78**: 209-218.

Östman, P.-Ö., Hellman, M., Sennerby, L. (2005) Direct implant loading in the edentulous maxilla using a bone density-adapted surgical protocol and primary implant stability criteria for inclusion. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **7** Suppl 1: S60-9.

Östman, P.-Ö., Hellman, M., Wendelhag, I., Sennerby, L. (2006) Resonance Frequency Analysis Measurements of Implants at Placement Surgery. *International Journal of Prosthodontics* **19**: 77-83.

Parlar, A., Bosshardt, D. D., Etiner, D., Schafroth, D., Ünsal, B., Hayta, C., Lang, N. P. (2009) Effects of decontamination and implant surface characteristics on re-osseointegration following treatment of peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 391-399.

Pasyk, K. A., Hassett, C. A. (1989) Modified hematoxylin and eosin staining method for epoxy-embedded tissue sections. *Pathology-Research and Practice* **184**:635-638.

Pjetursson BE, Karoussis I, Bürgin W, Brägger U, Lang N. P. (2005) Patient' satisfaction following implant therapy. *Clinical Oral Implant Research*; **16**: 185-93.

- Preibisch, S., Saalfeld, S., Tomancak, P. (2009) Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* **25**: 1463-1465.
- Raghavendra, S., Wood, M. C., Taylor, T. D. (2005) Early wound healing around endosseous implants: A review of the literature. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **20**: 425-431
- Roriz, V. M., Rosa, A. L., Peitl, O., Zanotto, E. D., Panzeri, H., De Oliveira, P. T. (2010) Efficacy of a bioactive glass-ceramic (biosilicate®) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 148-155.
- Roschger P., Gupta H.S., Berzlanovich A., Ittner G., Dempster D. W., Fratzl P., Cosman F., Parisien M., Lindsay R., Nieves J. W., Klaushofer K. (2003) Constant mineralization density distribution in cancellous human bone. *Bone* **32**:316-323.
- Santis, E. D., Botticelli, D., Pantani, F., Pereira, F. P., Beolchini, M., Lang, N. P. (2011) Bone regeneration at implants placed into extraction sockets of maxillary incisors in dogs. *Clinical Oral Implant Research* **22**: 430-437.
- Scarano, A., Degidi, M., Iezzi, G., Petrone, G., Piattelli, A. (2006) Correlation between implant stability quotient and bone-implant contact: A retrospective histological and histomorphometrical study of seven titanium implants retrieved from humans. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **8**: 218-222.
- Schliephake, H., Donnerstag, F., Berten, J. L., Lönquist, N. (2006) Palate morphology after unilateral and bilateral cleft lip and palate closure. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **35**: 25-30.
- Schulte, W., Lukas, D. (1993) Periotest to monitor osseointegration and to check the occlusion in oral implantology. *The Journal of Oral Implantology* **19**: 23-32.
- Sennerby, L., Meredith, N. (1998) Resonance frequency analysis: measuring implant stability and osseointegration. *Compendium in Continuing Education in Dentistry* **19**: 493-502.
- Sennerby, L., Persson, L. G., Berglundh, T., Wennerberg, A., Lindhe, J. (2005) Implant stability during initiation and resolution of experimental periimplantitis: An experimental study in the dog. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **7**: 136-140.
- Sennerby, L., Meredith, N. (2008) Implant stability measurements using resonance frequency analysis: biological and biomechanical aspects and clinical implications. *Periodontology 2000* **47**: 51-66.
- Sjöström, M., Lundgren, S., Nilson, H., Sennerby, L. (2005) Monitoring of implant stability in grafted bone using resonance frequency analysis A clinical study from implant placement to 6 months of loading. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **34**: 45-51.
- Sjöström, M., Sennerby, L., Nilson, H., Lundgren, S. (2007) Reconstruction of the atrophic edentulous maxilla with free iliac crest grafts and implants: a 3-year report of a prospective clinical study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. **9**:46-59.

Bibliografia

Stadlinger, B., Bierbaum, S., Grimmer, S., Schulz, M. C., Kuhlisch, E., Scharnweber, D., Eckelt, U., Mai, R. (2009) Increased bone formation around coated implants. *Journal of Clinical Periodontology* **36**: 698-704.

Stadlinger, B., Hintze, V., Bierbaum, S., Möller, S., Schulz, M. C., Mai, R., Kuhlisch, E., Heinemann, S., Scharnweber, D., Schnabelrauch, M., Eckelt, U. (2012) Biological functionalization of dental implants with collagen and glycosaminoglycans-A comparative study. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **100 B**: 331-341.

Song, J. K., Cho, T. H., Pan, H., Song, Y. M., Kim, I. S., Lee, T. H., Hwang, S. J., Kim, S. J. (2009) An electronic device for accelerating bone formation in tissues surrounding a dental implant. *Bioelectromagnetics* **30**: 374-384.

Sullivan, D.Y., Sherwood, R.L., Collins, T.A., Krogh, P.H. (1996) The reverse-torque test: a clinical report. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **11**:179-185.

Szmukler-Moncler, S., Salama, H., Reingewirtz, Y., Dubruille, J. H. (1998) Timing of loading and effect of micromotion on bone-dental implant interface: Review of experimental literature. *Journal of Biomedical Materials Research* **43**: 192-203.

Tavares, M. G., Tambasco De Oliveira, P., Nanci, A., Hawthorne, A. C., Rosa, A. L., Xavier, S. P. (2007) Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 452-458

Testori, T., Del Fabbro, M., Feldman, S., Vincenzi, G., Sullivan, D., Rossi Jr., R., Anitua, E., Bianchi, F., Francetti, L., Weinstein, R. L. (2002) A multicenter prospective evaluation of 2-months loaded Osseotite® implants placed in the posterior jaws: 3-year follow-up results. *Clinical Oral Implant Research* **13**: 154-161.

Turkyilmaz, I. (2006) A comparison between insertion torque and resonance frequency in the assessment of torque capacity and primary stability of Brånemark system implants. *Journal of Oral Rehabilitation* **33**: 754-759

Valderrama, P., Oates, T., Jones, A., Simpson, J., Schoolfield, J. Cochran, D. (2007) Evaluation of Two Different Resonance Frequency Devices to Detect Implant Stability: A Clinical Trial. *Journal of Periodontics* **78**: 262-272.

Vidigal, G. M., Groisman, M., Gregório, L. H., Soares, G. D. A. (2009) Osseointegration of titanium alloy and HA-coated implants in healthy and ovariectomized animals: A histomorphometric study. *Clinical oral implants research* **20**: 1272-1277

Vignoletti, F., Johansson, C., Albrektsson, T., De Sanctis, M., San Roman, F., Sanz, M. (2009) Early healing of implants placed into fresh extraction sockets: An experimental study in the beagle dog. *de novo bone formation. Journal of Clinical Periodontology* **36**: 265-277.

Zhou, Y., Jiang, T., Qian, M., Zhang, X., Wang, J., Shi, B., Xia, H., Cheng, X., Wang, Y. (2008) Roles of bone scintigraphy and resonance frequency analysis in evaluating osseointegration of endosseous implant. *Biomaterials* **29**: 461-474.

Zix, J., Hug, S., Kessler-Liechti, G., Mericske-Stern, R. (2008) Measurement of dental implant stability by resonance frequency analysis and damping capacity assessment: Comparison of both techniques in a clinical trial. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **23**: 525-530.

ABREVIATURAS

μCT	<i>Microcomputerized Tomography</i> (Microtomografía computarizada)
AES	<i>Auger Electron Spectroscopy</i>
AFR	Análisis de Frecuencia de Resonancia
BA	<i>Bone Area in threads</i> (Área entre espiras)
BIC	<i>Bone-to-Implant Contact</i>
BS-SEM	<i>Back Scattering Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersados)
BTC	<i>Bone Trabecular Connectivity</i> (Conectividad trabecular del hueso)
BVD	<i>Bone Volume Density</i> (Densidad del volumen de hueso)
CEEA	Comisión Ética de Experimentación en Animales
CLSM	<i>Confocal Laser Scanner Microscopy</i> (Microscopía de rastreo laser confocal)
DBBM	<i>Deproteinized Bovine Bone Mineral</i> (Mineral de hueso bovino desproteínizado)
DE	Desviación Estándar
EIL	<i>Effective Implant Length</i> (Longitud del implante efectiva)
FR	Frecuencia de Resonancia
ISQ	<i>Implant Stability Quocient</i>
ITV	<i>Insertion Torque Value</i> (Valor del torque de inserción)
PTV	<i>Periotest[®] Value</i> (Valores de Periotest [®])
QCT	<i>Quantitative Computerized Tomography</i> (Tomografía computarizada cuantitativa)
SBM	<i>Soluble Blasting Media</i> (Arenado con partículas solubles)
SLA	<i>Sandblasted Large Grit Acidetched</i> (Arenado con partículas grandes y grabado ácido)

LISTADO de TABLAS

Tabla 1.1.	Factores que influyen en la estabilidad primaria	5
Tabla 1.2.	Factores que influyen en la estabilidad secundaria	5
Tabla 1.3.	Métodos para medir la estabilidad de un implante: no-invasivos e invasivos.....	8
Tabla 4.1.	Porcentaje del contacto hueso-implante (BIC%).....	41
Tabla 4.2.	Valores ISQ de todas las mediciones de FR.....	42
Tabla 5.1.	Revisión bibliográfica sobre la correlación entre ISQ y BIC	49

LISTADO de FIGURAS

- Fig. 1.1.** Cambio de la estabilidad en el momento de la colocación del implante a la estabilidad secundaria creada por deposición de hueso nuevo (osteointegración) en humanos (Raghavendra et al 2005)..... 6
- Fig. 1.2.** Esquema de la técnica AFR (Sennerby y Meredith 1998). En negro, el transductor atornillado al implante 11
- Fig. 1.3.** Esquema de la medición de valores ISQ con la versión magnética de Osstell®. Fijación al implante del aditamento SmartPeg® correspondiente. (The Implant Stability Quotient Whitebook, en <http://www.isqforum.com>; 1/10/2013)..... 12
- Fig. 1.4.** Posibles escenarios en la progresión de la estabilidad de un implante en términos ISQ, expresado en el tiempo. Las líneas azules convergentes muestran las dos opciones más probables, con una estabilidad del implante, eventualmente llegando alrededor de los 70 ISQ. a) Valor inicial ISQ elevado que tiende a disminuir, a medida que la estabilidad mecánica es substituida por la estabilidad biológica. b) Valor inicial de estabilidad bajo que tiende a aumentar a medida que la osteointegración progresa. En el caso de la recta color rojo, la osteointegración no progresa según lo planificado, y puede resultar en la pérdida del implante. (The Implant Stability Quotient Whitebook, en <http://www.isqforum.com>; 1/10/2013) 14
- Fig. 1.5.** SEM, esquema general de sus componentes (Aballe et al. 1996)..... 17
- Fig. 1.6.** Representación esquemática de las diferentes interacciones que podrían ocurrir cuando un electrón pasa a través de un material. En gris están las interacciones para el SEM y AES 18
- Fig. 1.7.** Representación esquemática del principio de microscopía confocal 19
- Fig. 3.1.** Diseño y temporalización de las diferentes fases del estudio del estudio 30

Fig. 3.2. Determinación de los valores ISQ. En la imagen, medición tomada en sentido vestíbulo-lingual	32
Fig. 3.3. Procesado de las muestras: a) Deshidratación, b) Inclusión en resina, c) Sección en el eje longitudinal medial del implante, d) Pulido	33
Fig. 3.4. Determinación del contacto hueso-implante (BIC) basada en imágenes de microscopía electrónica de barrido con electrones retrodispersados (BS-SEM). (a) Imagen estereoscópica de una muestra. (b) Imagen de un implante completo conformada a partir de 14 imágenes BS-SEM. Obsérvese la diferencia en intensidad entre el implante (blanco) y el tejido óseo (gris). (c) Imagen binaria del implante segmentado. (d) Perfil del implante después de dilatarlo. Se retira la línea del borde externo (punta de flecha negra). (e) Línea de intersección entre (d) y (b). (e' y e'') Inserciones de áreas verde (e') y roja (e'') en (b). El implante se colorea en azul. Puntas de flecha en verde y rojo en (e–e'') señalan una región con y sin BIC, respectivamente. Escala barra: 1 mm	34
Fig. 4.1. Progresión del contacto hueso-implante. a-f) imágenes BS-SEM de diferentes implantes a 0, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 semanas, respectivamente. Obsérvese el incremento del BIC a lo largo del tiempo. Todas las imágenes están a la misma escala	40
Fig. 4.2. Valores de medias y medianas del BIC% en el periodo de mediciones de ocho- semanas del estudio. Cada valor corresponde a una unidad de seis implantes. Las líneas discontinuas corresponden al intervalo de confianza del 95%	41
Fig. 4.3. Progresión del contacto hueso-implante. Detalle de las seis espiras a las 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 6 (e) y 8 (f) semanas, respectivamente. Los implantes se muestran en blanco, el hueso en gris y la línea donde se mide el BIC en color azul. El grosor de la línea se ha ampliado con fines de representación. Obsérvese como la línea azul incrementa el solapamiento con el hueso a lo largo del tiempo debido al incremento de hueso que llena la espira. Todas las imágenes están a la misma escala.....	42

Fig. 4.4. Diagrama de los valores ISQ obtenidos con el aparato Ostell Mentor[®] desde el día 0 a la semana 8. La desviación estándar (DE) se muestra en líneas discontinuas 43

Fig. 4.5. Correlación entre los valores de ISQ y BIC% 43