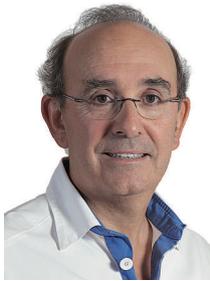




REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



Anitua, Eduardo

Licenciado en Odontología.
Licenciado en Medicina. Doctor
en Medicina. Investigador
científico, Eduardo Anitua
Foundation, Vitoria, España.
Director científico de BTI-
Biotechnology Institute, Vitoria,
España.

Indexada en / Indexed in:

- IME
- IBECs
- LATINDEX
- GOOGLE ACADÉMICO

Correspondencia:

Dr. Eduardo Anitua.
Eduardo Anitua Foundation
C/ Jose Maria Cagigal 19
01007 Vitoria, España
eduardoanitua@eduardoanitua.com
Tel. 945 160 653.

Fecha de recepción: 18 de enero de 2017.
Fecha de aceptación para su publicación:
8 de marzo de 2018.

unicca®: nueva superficie de implantes para acelerar la oseointegración

Anitua E.
UnicCa®: nueva superficie de implantes para acelerar la oseointegración. Cient. Dent. 2018; 15; 1; 53-60

RESUMEN

La superficie de los implantes dentales es un parámetro fundamental a considerar para mejorar la regeneración ósea basada en implantes. Junto con las técnicas quirúrgicas y los materiales y herramientas empleados, las modificaciones superficiales de los implantes han ido evolucionando con el tiempo para permitir acortar los tiempos de tratamiento y abordar reconstrucciones cada vez más complejas.

La superficie unicCa® resulta de la incorporación a la superficie multirrugosa optima® de una capa de iones de calcio. Las modificaciones realizadas en el desarrollo de esta nueva superficie hacen que presente ventajas como: impedimento del envejecimiento del óxido de titanio, mejora de la unión hueso-implante y aceleración de la fase de la osteointegración. Para demostrar las propiedades de esta nueva superficie se realizaron estudios en cóndilo femoral de conejo y en tibia de oveja. En ambos casos se demostró un incremento y aceleración de la osteointegración.

El calcio, presente en la superficie unicCa®, asegura la estimulación celular desde los primeros momentos tras la implantación hasta la consolidación de los tejidos y la formación de la capa calcificada de osteointegración de la que es el constituyente principal. Esto implica una regeneración peri-implante más rápida y de mejor calidad.

PALABRAS CLAVE

Calcio; Oseointegración; Estimulación celular.

unicca®: new surface implants to accelerate the osseointegration

ABSTRACT

The surface of the dental implants is a fundamental parameter to consider for improving bone regeneration based on implants. Together with the surgical techniques and materials and tools used, surface modifications of the implants have evolved over time to allow to shorten treatment times and address increasingly complex reconstructions.

The unicCa® surface is the result of the addition to the optima® surface of a layer of calcium ions. The modifications made in the development of this new surface make this advantages such as: impairment of the aging of the titanium oxide, improvement of the union bone-implant and acceleration of the phase of the osseointegration. To demonstrate the properties of this new area studies were performed in rabbit femoral condyle and in tibia of sheep. In both cases showed an increase and acceleration of the osseointegration.

The calcium, present on the the unicCa® surface ensures the cellular stimulation from the first moments after implantation until the consolidation of the tissues and the formation of the osseointegration of calcified layer which is the main constituent. This implies a regeneration peri-implant faster and of better quality.

KEY WORDS

Calcium; Oseointegration; Cellular stimulation.

INTRODUCCIÓN

El éxito de los implantes intraóseos reside en una correcta osteointegración, es decir, en la unión directa, duradera y funcional del hueso preexistente y neoformado con sus superficies. La configuración de estas superficies es, por lo tanto, un parámetro fundamental a considerar para mejorar la regeneración ósea basada en implantes. Junto con las técnicas quirúrgicas y los materiales y herramientas empleados, las modificaciones superficiales de los implantes han ido evolucionando con el tiempo para permitir acortar los tiempos de tratamiento y abordar reconstrucciones cada vez más complejas. Después del salto cualitativo que supusieron las superficies microrrugosas y nanorugosas con la culminación de la superficie multirrugosa y porosa optima[®], el paso siguiente consiste en la modificación adicional de estas superficies con elementos con capacidad de inducir activamente modificaciones en el microentorno del implante que modulen y conduzcan favorablemente la regeneración. Para ello, la superficie optima[®] ha sido modificada químicamente con calcio, un ión bioinorgánico fundamental en la regeneración ósea. Esta nueva superficie es la superficie unicCa[®], por sus propiedades únicas de unión hueso-implante a través del calcio.

De entre los elementos más relevantes en los diferentes y complejos procesos de regeneración ósea, el calcio es el único que está presente en todas las fases, desde la fase hemostática inicial hasta la biomineralización y el remodelado óseo¹⁻³.

Durante las fases iniciales, la liberación de iones de calcio desde la superficie del implante induce la adhesión y la activación plaquetaria con la consiguiente liberación de los factores de crecimiento intragranulares en ellas contenidos⁴⁻⁷. Este proceso permite generar un gradiente químico que provoca la atracción a la superficie del implante de las células mesenquimales y osteoprogenitoras⁸⁻¹⁰ y la estimulación de su actividad generadora de hueso¹¹⁻¹³.

A través de la activación plaquetaria se desencadenan los procesos que llevan a la conversión, mediada por la trombina endógena, del fibrinógeno en fibrina. Este proceso es esencial

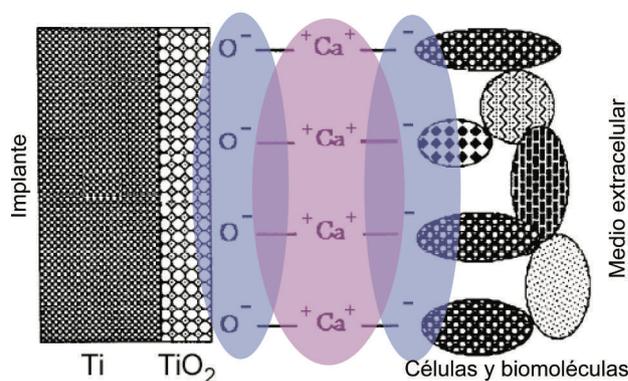


Figura 1. Esquema ilustrativo de la modificación iónica de la superficie del implante con calcio. El calcio es un catión bivalente que actúa como puente electrostático para la unión de numerosas biomoléculas con importantes funciones en la regeneración. Modificado a partir de Ellingsen (1991)¹⁷.

para la coagulación. De nuevo, si el proceso se induce desde la superficie del implante, la formación del coágulo lleva a la estabilización de todo el implante y supone un estímulo bioquímico y biomecánico para el reclutamiento de más células osteogénicas. Además, la estructura tridimensional de la fibrina con agregados plaquetarios es un microentorno osteoinductivo, fundamental para las fases proliferativas posteriores.

Por otro lado, el calcio es un constituyente fundamental en la interfase de los implantes osteointegrados. No solo se encuentra en la estructura mineral, sino también incorporado a los grupos aniónicos de las proteínas no colágenas ácidas que constituyen las primeras capas de osteointegración^{14,15}. La razón de este fenómeno parece estar ligada al hecho de que los iones de calcio en las superficies de titanio modifican su carga superficial (de ligeramente negativa a positiva) y, por lo tanto, la composición inicial del proteoma adsorbido^{16,17} (Figura 1).

Por todo ello, modificar la superficie de los implantes con iones de calcio permite controlar la composición inicial de su microentorno ya que este ión bioinorgánico posee importantes funciones reguladoras cruciales para desencadenar todas las fases regenerativas posteriores^{6,7}. EL objetivo de este trabajo es mostrar como las modificaciones realizadas en la superficie UnicCa[®] afectan a la integración del implante.

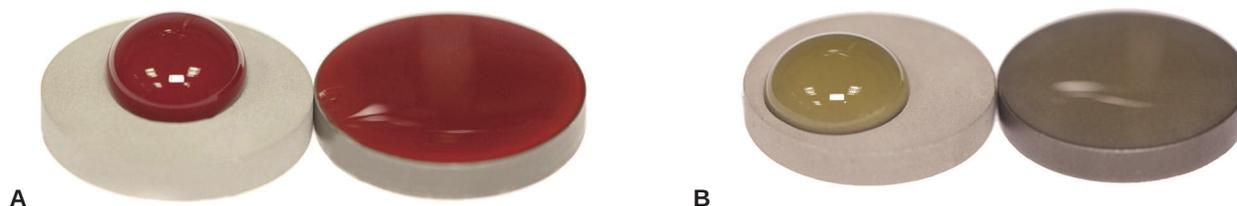


Figura 2. a) Humectación de discos sin modificar (izquierda) y b) modificados con calcio (derecha) después de un mes expuestos al aire. Se puede observar que un mismo volumen de sangre o plasma rico en factores de crecimiento (PRGF-Endoret) se distribuye de manera completamente distinta en función de la presencia o no de calcio. El calcio actúa protegiendo e hidrofiliando completamente la superficie de los implantes, lo que permite una humectación instantánea y completa.

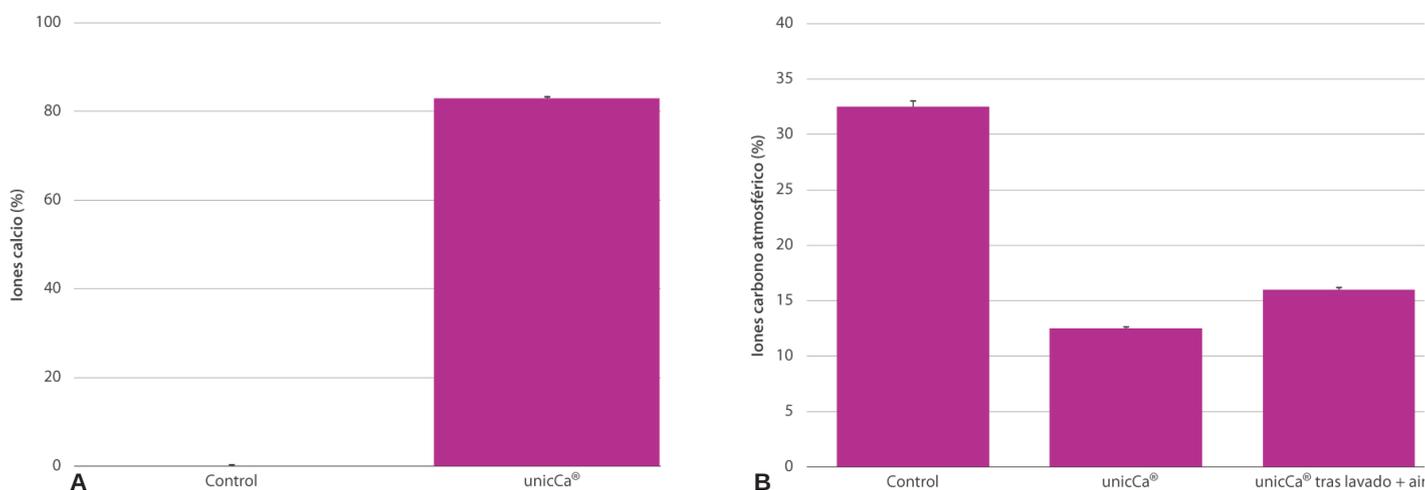


Figura 3. Análisis composicional de las superficies mediante ToF SIMS. Los iones positivos relativos a la presencia de calcio (a) y a la presencia de hidrocarburos provenientes de la atmósfera ambiente (b) están agrupados y expresados como % del total de iones detectados. (a) Los iones de calcio están naturalmente ausentes en la superficie control, mientras que son claramente abundantes en la superficie unicCa®. (b) Mientras en el control, expuesto a la atmósfera ambiente, el óxido de titanio reacciona con los hidrocarburos ambientales y queda cubierto en más de un 30%, la superficie unicCa® reduce ese porcentaje al 12%. Incluso después de lavar la superficie unicCa® y exponerla al aire, la cantidad de carbono adsorbido no sobrepasa el 16%, es decir menos de la mitad que en la superficie control. (Tejero y cols., 2013⁶).

CARACTERÍSTICAS DE LA SUPERFICIE UNICCA® DATOS EXPERIMENTALES

La superficie unicCa® resulta de la incorporación a la superficie multirrugosa optima® de una capa de iones de calcio. Esta modificación química, higroscópica y polar le da al implante su aspecto húmedo único y característico pero, lo más importante, convierte la superficie en superhidrofílica. Esto implica el contacto completo de la sangre y el plasma con todos los puntos de la superficie, incrementando al máximo la superficie activa para la regeneración (Figura 2). Ya desde el posicionamiento del implante en el lugar de implantación, la superficie se recubre automáticamente por capilaridad.

1. UnicCa® impide el envejecimiento del óxido de titanio

Además, la modificación con iones de calcio justo después del acondicionamiento y fotoactivación del óxido de titanio en sala blanca, permite proteger la superficie en las condiciones más favorables para la osteointegración. La fotoactivación del titanio permite obtener mejores resultados de osteointegración^{18,19} y tiene conocidos efectos antibacterianos (Figura 3)^{20,21}.

Debido a que la fotoactivación del titanio tiene una duración limitada en el tiempo, se han desarrollado técnicas para su aplicación en clínica, justo antes de la implantación. Esta técnica implica la adquisición de un equipo de ultravioleta y el tratamiento en la misma clínica de cada uno de los implantes a utilizar. Sin embargo, la superficie unicCa® ya incorpora los beneficios de la fotoactivación sin necesidad de realizar ningún paso adicional en la clínica ni comprar equipos específicos. Esto se debe a que modificación iónica con calcio protege continuamente la superficie nativa del implante.

2. Interacción del calcio de unicCa® con los tejidos

Mediante la medida de la cinética de liberación del calcio desde las superficies unicCa®, se ha podido determinar que los iones se liberan al microentorno del implante en dos fases⁷

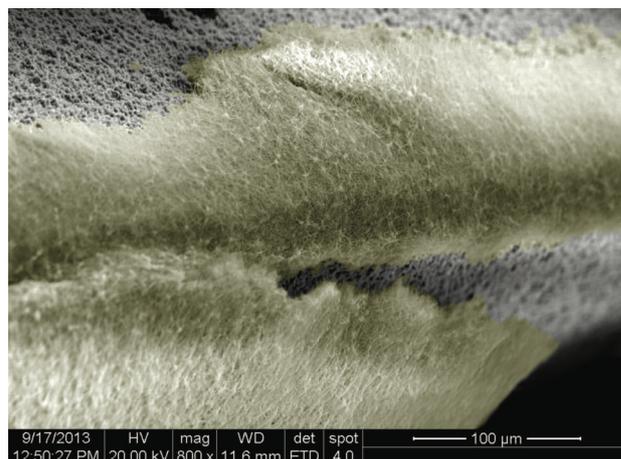


Figura 4. Imagen de microscopía electrónica por electrones secundarios de la espira de un implante unicCa después de entrar en contacto con PRGF-Endoret. Se puede observar la formación de la red de fibrina que cubre parte de la espira con numerosos agregados plaquetarios en su interior.

Fase 1: Liberación instantánea. La liberación de calcio que se produce desde la superficie en el instante mismo de la colocación del implante desencadena los procesos de adhesión y activación plaquetaria y la formación del coágulo en directa aposición sobre la superficie del implante (Figura 4).

De esta manera, la formación en unos pocos minutos de la matriz provisional sobre el implante permite su estabilización y condiciona favorablemente las etapas posteriores de la regeneración. Esto se traduce en una osteointegración más temprana y de mejor calidad.

Fase 2: Liberación sostenida. La liberación progresiva de calcio se produce durante más de 81 días postimplantación⁷ y permite el mantenimiento de un gradiente de concentración que estimula la continuidad del proceso con las siguientes fases de adhesión celular y mineralización de la matriz extracelular (Figuras 5 y 6).

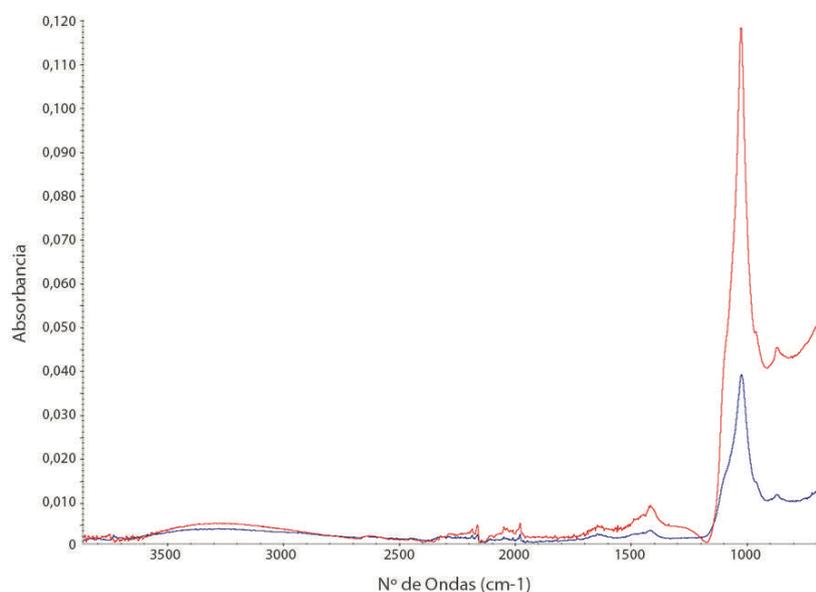


Figura 5. Estimulación de la biomineralización ósea *in vitro* a -5mA durante 20 min en un electrolito de $\text{Ca}^{2+}/\text{HxPO}_4^{3-}$ en condiciones fisiológicas de pH y temperatura según Tejero y cols. (2010)²². Las diferencias de intensidad en los picos a 1090, 1026, 962 y 872 cm^{-1} revelan una mayor formación de hidroxiapatita en las superficies unicCa® (curva roja) (asignación de picos según referencias²³⁻²⁵).

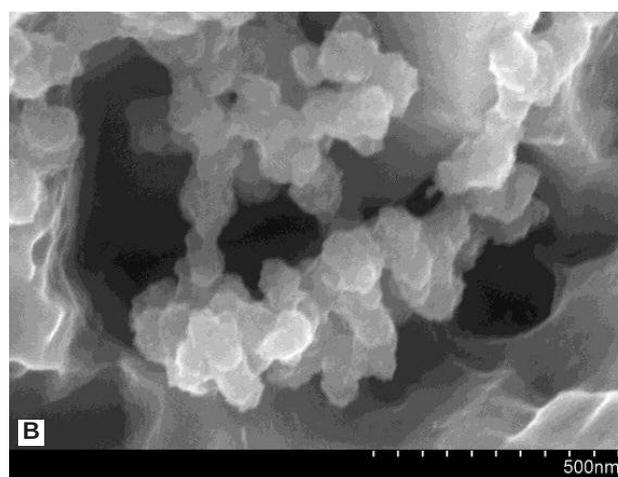
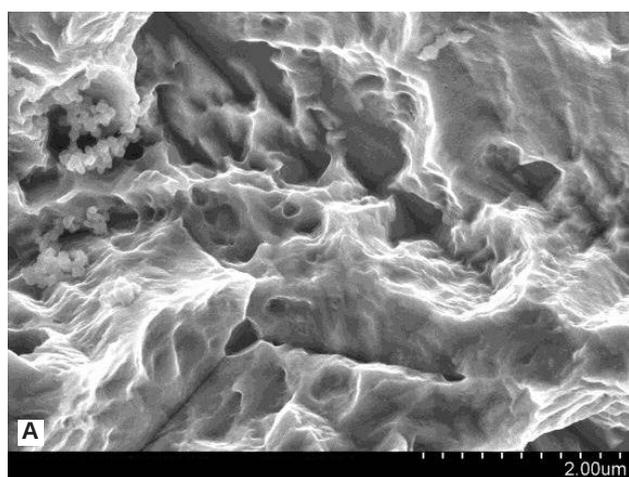


Figura 6. Proceso de nucleación de la fase cristalina ósea en la superficie unicCa®. Microscopía electrónica de barrido con electrones secundarios. a) 20.000 aumentos. b) 100.000 aumentos.

La presencia de niveles elevados de calcio en las superficies unicCa® induce condiciones de supersaturación y, con ello, la nucleación más temprana de la fase cristalina ósea, la hidroxiapatita. La modificación iónica con calcio supone que, en ensayos de biomineralización bajo estimulación electroquímica²²⁻²⁵, la superficie unicCa® produce una mayor densidad de mineralización (Figura 7).

3. Interacción del calcio de unicCa® con los tejidos

La función principal de los implantes intraóseos es la de integrarse en el hueso de manera que puedan soportar la prótesis y sus cargas funcionales asociadas. Esta función deja de cumplirse cuando, por múltiples factores, se produce la contaminación bacteriana progresiva de la superficie del implante que acaba con parte del hueso que lo sustentaba. Este fenómeno, conocido como peri-implantitis, es de una relevancia funda-

mental, ya que incide directamente en la calidad de la implantación en el medio y largo plazo. Hay múltiples factores que influyen en los procesos de mucositis y peri-implantitis y también métodos para evitarlos y, llegado el caso, tratarlos. Una guía completa sobre este fenómeno se puede consultar²⁶.

Las superficies de implantes deben por tanto equilibrar por un lado el mantenimiento de los tejidos blandos con una baja o nula afinidad para la adhesión bacteriana. Este equilibrio es difícil de conseguir ya que, generalmente, la adhesión no es selectiva. Sin embargo, se puede modular la topografía de las zonas más expuestas a los patógenos de la cavidad oral, para maximizar el mantenimiento de los tejidos y minimizar la adhesión bacteriana, como es el caso del diseño optima® en el cuello²⁷.

La modificación química con calcio va un paso más allá en esta dirección. En este artículo mostramos los resultados de investi-

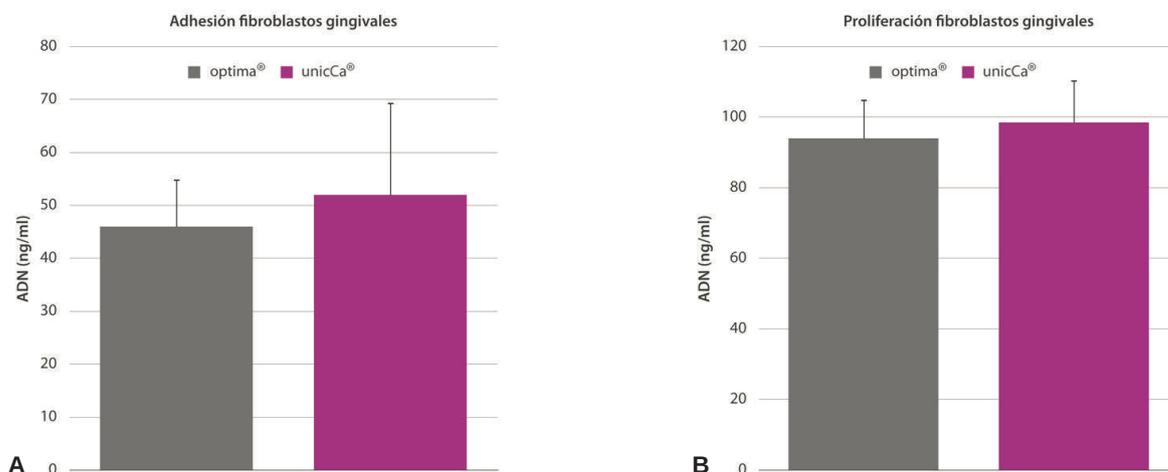


Figura 7. Resultados de ensayos celulares con células primarias extraídas de tejido gingival de pacientes sometidos a cirugía oral. a) Adhesión a los 30 min. b) Proliferación a las 72h * señala diferencias estadísticamente significativas ($p < .05$) entre superficies. (Anitua y cols²⁸)

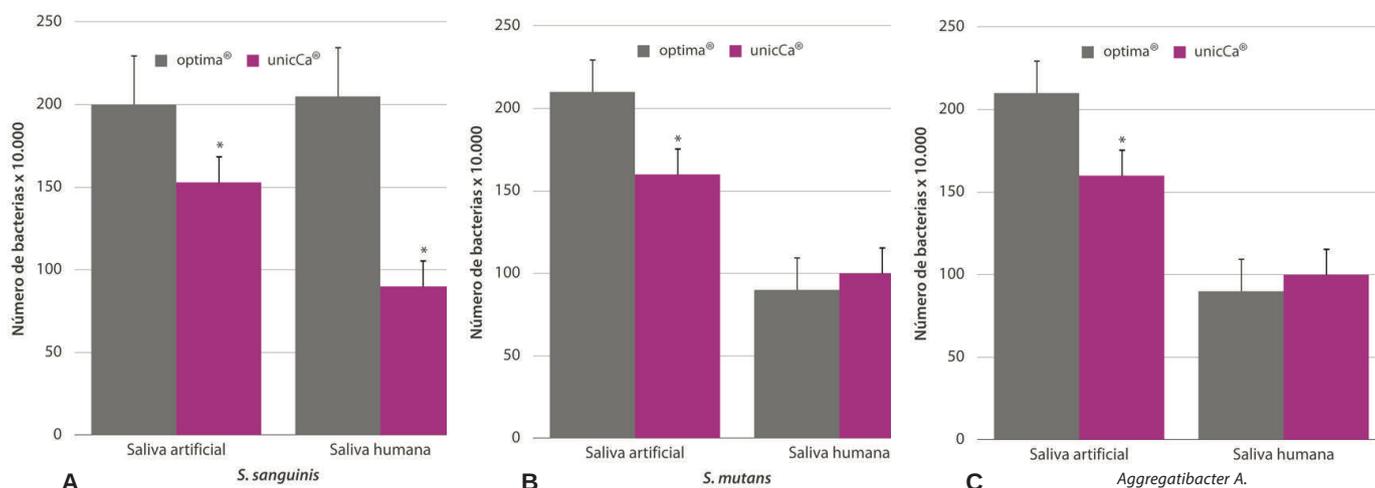


Figura 8. Resultados de adhesión bacteriana de tres cepas de la placa subgingival (a. *S. Sanguinis*, b. *S. Mutans*, c. *Aggregatibacter A.*). * señala diferencias estadísticamente significativas ($p < .05$) entre superficies. Anitua²⁶.

gación sobre cultivos de células formadoras de tejido queratinizado de encía en comparación con la adhesión bacteriana de distintas bacterias típicas de la cavidad oral (Figura 8).

En líneas generales, la superficie unicCa® mejora la función celular fibroblástica con respecto a los ya muy buenos resultados superficie optima®cuello²⁷ mediante una mayor estimulación autocrina de la síntesis de fibronectina. Y lo que es más importante, la superficie unicCa® consigue una atenuación significativa de la adhesión bacteriana. Estos resultados indican un menor riesgo de estas superficies para sufrir fenómenos de peri-implantitis.

4. Interacción del calcio de unicCa® y la capacidad de oseointegración

La capacidad de osteointegración de los implantes modificados con calcio se ha evaluado in vitro, a través de la estimulación de las células osteogénicas e in vivo, a través de dos estudios preclínicos llevados a cabo en animales.

Estudios in vitro. Los estudios celulares con osteoblastos primarios obtenidos con consentimiento a partir de hueso de pa-

cientes sometidos a cirugía oral, revelan que la superficie modificada con calcio unicCa® permite una mayor adhesión y proliferación de los osteoblastos y también les induce a una mayor síntesis de matriz extracelular²⁷⁻²⁹. Todos estos datos apuntan a una estimulación mediada por el calcio de la actividad celular osteogénica. Para poder confirmar estos datos, el paso siguiente fue la experimentación in vivo.

Estudios in vivo. El primer modelo de osteointegración fue en cóndilo femoral de conejo ya que la anatomía del hueso y sus dimensiones son muy parecidas al hueso maxilar humano más esponjoso. La osteointegración se evaluó a las 8 semanas post-inserción (Figura 9)³⁰. En el segundo estudio se realizó en tibia de oveja³¹, para evaluar así el comportamiento de esta nueva superficie en un modelo de hueso más cortical. El tiempo de osteointegración en las tibias fue de 12 semanas. Durante los períodos de curación, no se registraron complicaciones y todos los implantes pudieron servir para el estudio (n=6 por superficie en el caso del modelo de conejo y n=8 por superficie en el caso del modelo de

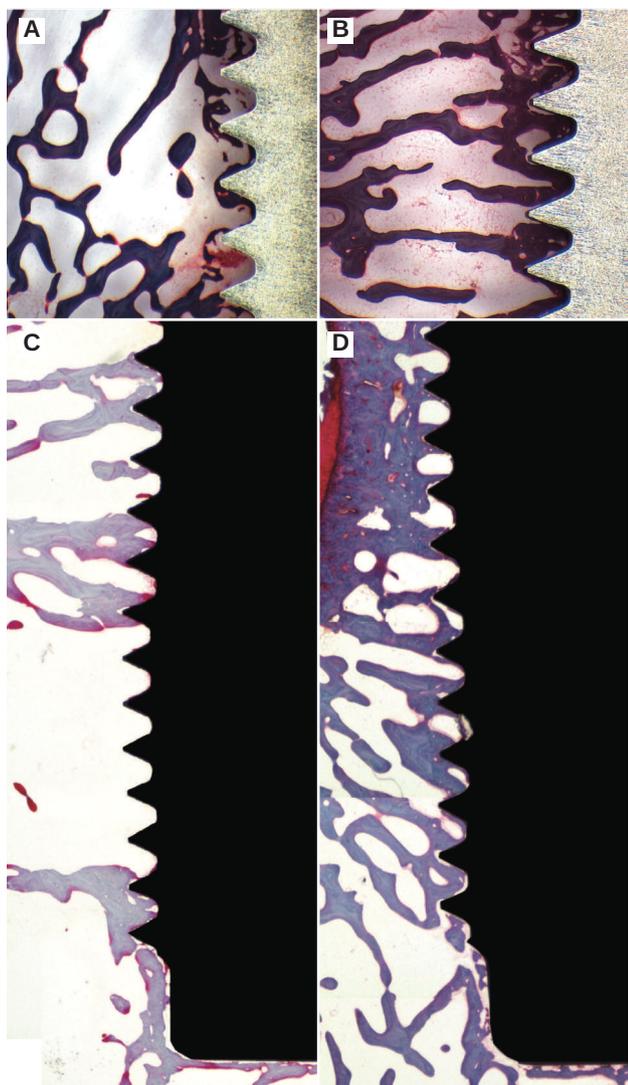


Figura 9. Cortes histológicos de los implantes osteointegrados en cóndilo femoral de conejos durante 8 semanas. Tinción de hematoxilina de Harris y tricrómico de Wheatley. El tono rojizo muestra un hueso menos mineralizado y el tono azulado, un hueso más mineralizado y maduro. a) y c), superficie *optima*®, b) y d) superficie *unicCa*®. Ancho de las imágenes: 3,4 mm. Anitua y cols., 2015²⁸.

oveja). Tras el sacrificio de los animales, las muestras fueron fijadas y preparadas para su evaluación histológica. Además, el corte y procesado de las muestras histológicas se llevó a cabo sin producción de artefactos, lo que dio lugar a dos cortes por implante en cada uno de los estudios (n=12 y 16 respectivamente).

Los implantes con superficie *optima*® (control) y *unicCa*® (test) tuvieron una osteointegración completa, con trabéculas de hueso neoformado uniendo el hueso subcondral a la superficie del implante y generando, por tanto una estabilización lateral correcta. La Figura 10 muestra cortes histológicos representativos de la superficie control (*optima*®: a,c) y la superficie test (*unicCa*®: b,d). En las imágenes se puede observar una mayor aposición ósea en la superficie *unicCa*®.

El análisis histomorfométrico (datos presentados en la Figura 11 a y b) revela que la osteointegración de la superficie *unicCa*®

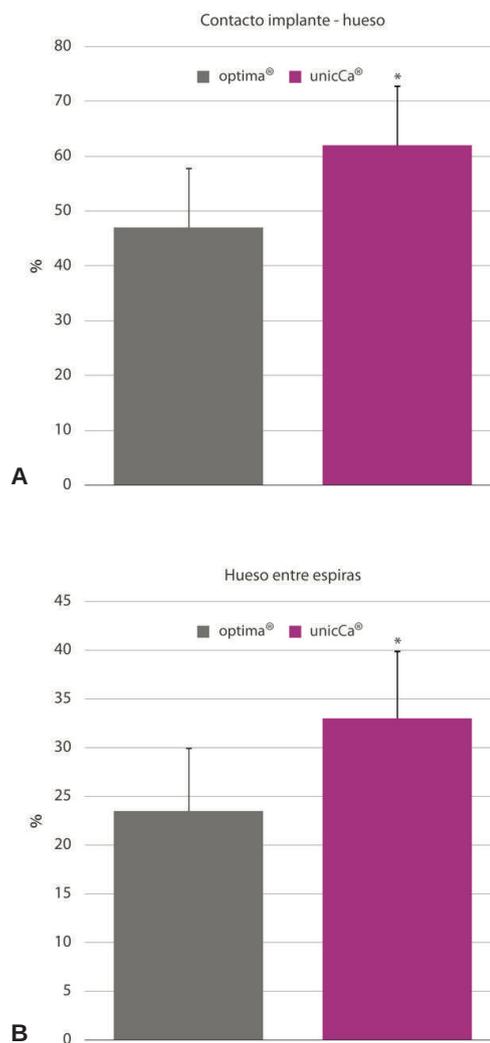


Figura 10. Modelo de cóndilo femoral de conejo. 8 semanas post-implantación. a) Porcentaje de hueso en contacto con las superficies. b) Porcentaje de hueso entre las espiras. * señala diferencias estadísticamente significativas ($p < .05$) entre superficies. Anitua y cols., 2015²⁸

en este hueso más esponjoso, fue significativamente superior a la conseguida por los implantes sin modificación de calcio, tanto en las medidas de contacto directo de el hueso nuevo con la superficie como en las de cantidad de hueso formado entre las espiras.

En el caso del modelo cortical de oveja, el hueso neoformado está completamente corticalizado tanto para la superficie *optima*® como para la superficie *unicCa*®. Las histologías representativas mostradas en la Figura 12 demuestran un elevado grado de mineralización derivado del intenso tono azul de la tinción. En el análisis histomorfométrico, se vuelve a observar una diferencia significativa a favor de la superficie *unicCa*® en el contacto implante-hueso pero el crecimiento del hueso entre las espiras, al ser una fase avanzada de formación de hueso cortical, no presenta diferencias entre ambos tipos de superficies.

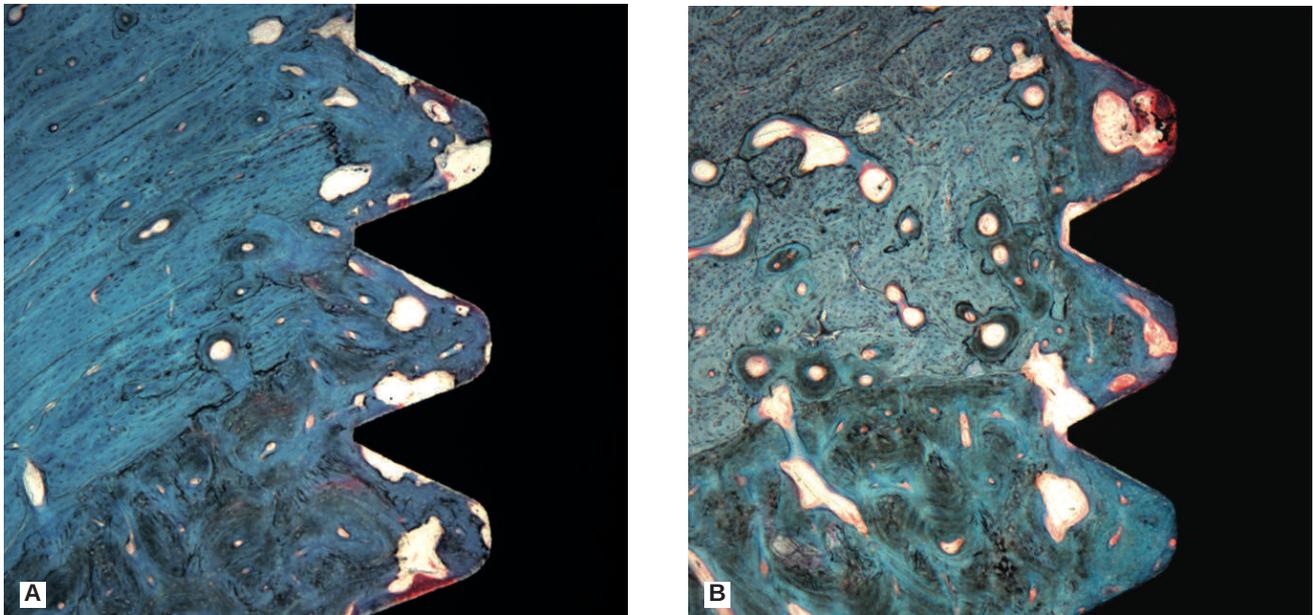


Figura 11. Cortes histológicos de los implantes osteointegrados en tibia de oveja durante 12 semanas. Tinción de hematoxilina de Harris y tricrómico de Wheatley. El tono muy azulado muestra un hueso completamente mineralizado (cortical) a) superficie optima®, b) superficie unicCa®. Ancho de las imágenes: 800 µm. Anitua y cols., 2015²⁸.

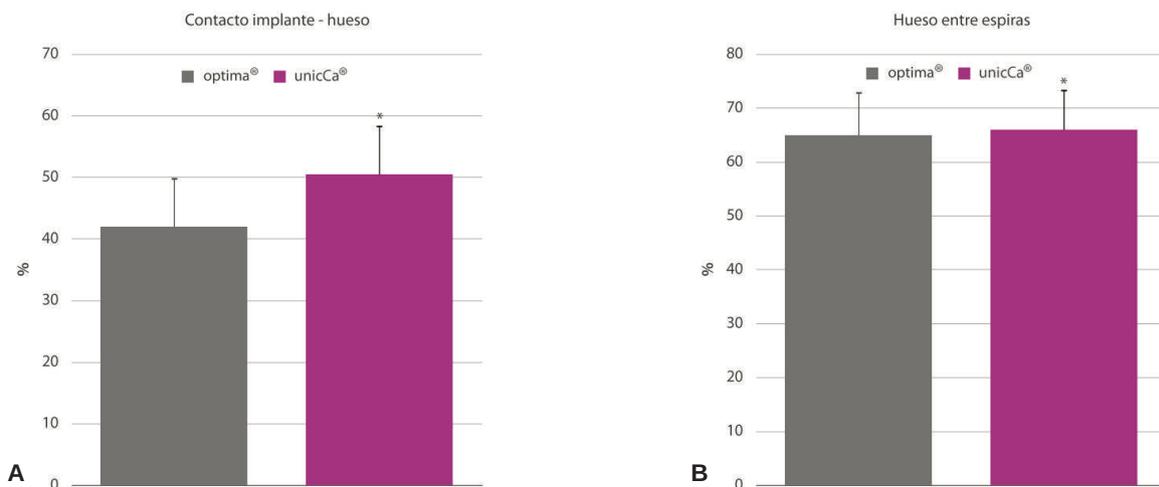


Figura 12. Modelo de tibia de oveja. 12 semanas post-implantación. a) Porcentaje de hueso en contacto con las superficies. b) Porcentaje de hueso entre las espiras. * señala diferencias estadísticamente significativas ($p < .05$) entre superficies. Anitua y cols., 2015²⁹.

CONCLUSIONES

El calcio es un ión bioinorgánico fundamental en la regeneración de los tejidos. El calcio, presente en la superficie unicCa®, asegura la estimulación celular desde los primeros momentos tras la implantación hasta la consolidación de los tejidos y la formación de la capa calcificada de osteointegración de la que es el constituyente principal. Esto implica una

regeneración peri-implante más rápida y de mejor calidad. La superficie unicCa® establece un sellado biológico frente a las agresiones bacterianas que asegura la pervivencia del implante y mitiga el riesgo de peri-implantitis. En definitiva, los resultados de la superficie modificada con calcio unicCa® permiten mejorar los excelentes resultados de la superficie optima® y asegurar una más rápida y segura osteointegración del implante.



BIBLIOGRAFÍA

1. Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* 2004 ;25: 5681–5703.
2. Mann S. Organic matrix-mediated biomineralization. In: Mann S, editor. *Biomineralization. Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press, New York, 2001. 89-124.
3. Marie PJ. The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* 2010; 46: 571–576.
4. Woulfe DS. Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2193-200.
5. Gupta S, Reviakine I. Platelet activation profiles on TiO₂: effect of Ca²⁺ binding to the surface. *Biointerphases* 2012; 7: 28-40.
6. Tejero R, Rossbach P, Keller B, Anitua E, Reviakine I. Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry with principal component analysis of titania-blood plasma interfaces. *Langmuir* 2013; 29: 902-912.
7. Anitua E, Prado R, Orive G, Tejero R. Effects of calcium-modified titanium implant surfaces on platelet activation, clot formation, and osseointegration. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103: 969-80.
8. Sánchez-Ilárduya MB, Trouche E, Tejero R, Orive G, Reviakine I, Anitua E. Time-dependent release of growth factors from implant surfaces treated with plasma rich in growth factors. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101: 1478-1488.
9. Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB, Watzek G. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets* 2004; 15: 29-35.
10. Anitua E, Tejero R, Zalduendo MM, Orive G. Plasma Rich in Growth Factors (PRGF-Endoret) promotes bone tissue regeneration by stimulating proliferation, migration and autocrine secretion on primary human osteoblasts. *J Periodontol* 2013; 84: 1180-1190.
11. Adams CS, Mansfield K, Perlot RL, Shapiro IM. Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions. *J Biol Chem* 2001; 276: 20316–22.
12. Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF, Riccardi D. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 5140–5.
13. Nakamura S, Matsumoto T, Sasaki J-I, Egusa H, Lee KY, Nakano T, Sohmura T, Nakahira A. Effect of calcium ion concentrations on osteogenic differentiation and hematopoietic stem cell niche-related protein expression in osteoblasts. *Tissue Eng Part A* 2010; 16: 2467–73.
14. McKee MD, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech* 1996; 33: 141–64.
15. Davies JE, Baldan N. Scanning electron microscopy of the bone-bioactive implant interface. *J Biomed Mater Res* 1997; 36: 429–40.
16. Tengvall P. Proteins at Titanium Interfaces. In: Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P, editors. *Titanium in medicine*. Berlin: Springer-Verlag; 2001, 458–83.
17. Ellingsen JE. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials* 1991; 12: 593–596.
18. Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, Ogawa T. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials* 2009 ;30: 1015-25.
19. Ueno T, Yamada M, Suzuki T, Minamikawa H, Sato N, Hori N, Takeuchi K, Hattori M, Ogawa T. Enhancement of bone-titanium integration profile with UV-photofunctionalized titanium in a gap healing model. *Biomaterials* 2010 ;31:1546-57.
20. Yamada Y, Yamada M, Ueda T, Sakurai K. Reduction of biofilm formation on titanium surface with ultraviolet-C pre-irradiation. *J Biomater Appl* 2013; 23: 161-171.
21. Gallardo-Moreno AM, Pacha-Olivenza MA, Fernández-Calderón MC, Pérez-Giraldo C, Bruque JM, González-Martín ML. Bactericidal behaviour of Ti6Al4V surfaces after exposure to UV-C light. *Biomaterials* 2010; 31: 5159–68.
22. Tejero R, Bierbaum S, Douglas T, Reinstorf A, Worch H, Scharnweber D. Glucuronic acid and phosphoserine act as mineralization mediators of collagen I based biomimetic substrates. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21: 407-18.
23. Fowler BO. Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution. *Inorg Chem* 1974; 13: 194–207. 56.
24. Gadaleta SJ, Paschalis EP, Camacho NP, Betts F, Mendelshon R, Boskey AL. Fourier Transform infrared spectroscopy of synthetic and biological apatites. In: Amjad Z, editor. *Mineral scale formation and inhibition*. New York: Plenum Press; 1995; 57:283–294.
25. Klee WE, Engel G. Infrared spectra of the phosphate ions in various apatites. *J Inorg Nucl Chem* 1970; 32: 1837–1843.
26. Anitua E. Perimplantitis: Un nuevo enfoque a la prevención y su tratamiento. Ed. Eduardo Anitua. Teamwork Media, Vitoria, España, 2014.
27. WP Superficie optima®: Balance entre osteointegración y riesgo de peri-implantitis. Estudio celular. Teamwork Media, Vitoria, España, 2013.
28. Anitua E, Piñas L, Murias A, Prado R, Tejero R. Effects of calcium ions on titanium surfaces for bone regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015 ;130: 173-81.
29. Anitua E, Prado R, Orive G, Tejero R. Effects of calcium-modified titanium implant surfaces on platelet activation, clot formation, and osseointegration. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103: 969-80.
30. Anitua E, Tejero R, Pacha-Olivenza MÁ, Fernández-Calderón MC, Delgado-Rastrolo M, Zalduendo MM, Troya M, Pérez-Giraldo C, González-Martín ML. Balancing microbial and mammalian cell functions on calcium ion-modified implant surfaces. *J Biomed Res B Appl Biomater* 2018; 106 (1): 421-432.
31. Anitua E, Murias-Freijo A, Piñas L, Tejero R, Prado R, Orive G. Nontraumatic Implant Explantation: A Biomechanical and Biological Analysis in Sheep Tibia. *J Oral Implantol* 2016; 42: 3-11.