



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Evaluación de la bioseguridad de la implantoplastia en el tratamiento de la periimplantitis

Jorge Toledano Serrabona

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

Programa de Doctorat en Medicina i Recerca Translacional

Evaluación de la bioseguridad de la implantoplastia en el tratamiento de la periimplantitis

Memoria de tesis doctoral presentada por

Jorge Toledano Serrabona

para optar al grado de doctor por la Universitat de Barcelona

Dirigida por:

Prof.^a Dra. M^a Àngels Sánchez Garcés

Prof. Dr. Cosme Gay Escoda

Departament d'Odontoestomatologia

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Universitat de Barcelona

2022



La Prof.^a Dra. M^a Àngels Sánchez Garcés, Profesora Agregada de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona y el Prof. Dr. Cosme Gay Escoda, Catedrático de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona,

CERTIFICAN: Que el presente trabajo que lleva como título: “Evaluación de la bioseguridad de la implantoplastia en el tratamiento de la periimplantitis” presentado por Jorge Toledano Serrabona como Tesis Doctoral, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departament d’Odontoestomatologia de la Universitat de Barcelona y corresponde fielmente a los resultados obtenidos. Una vez redactada la presente Memoria Doctoral ha sido revisada por nosotros y consideramos que cumple los requisitos para ser defendida y aspirar al Grado de Doctor en Medicina e Investigación Traslacional delante del tribunal que en su día se designe.

Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes firmamos el presente certificado.

Barcelona, 13 de octubre de 2022

Prof.^a Dra. M^a Àngels Sánchez Garcés
Profesora Agregada. Departament d’Odontoestomatologia. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona

Prof. Dr. Cosme Gay Escoda
Catedrático. Departament d’Odontoestomatologia. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona

Jorge Toledano Serrabona
Doctorando de la Escuela de Doctorado. Programa de Medicina e Investigación Traslacional. Universitat de Barcelona

A mis padres Luis y Montse

A mi hermana Paula

A Sandra

"Sabio no es el hombre que proporciona las respuestas verdaderas, es el que formula las preguntas verdaderas".

Claude Lévi-Strauss

Agradecimientos

Este proyecto no hubiese llegado a buen puerto sin la ayuda de muchas personas que han contribuido con su trabajo y su inestimable apoyo. Ha sido para mí un honor colaborar con cada uno de vosotros y vosotras.

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a los directores de la presente tesis doctoral; la Prof.^a Dra. M^a Àngels Sánchez Garcés, Profesora Agregada de la Universitat de Barcelona, y el Prof. Dr. Cosme Gay Escoda, Catedrático de la Universitat de Barcelona. Ambos son una fuente de inspiración y un reflejo de lo que algún día quisiera ser. Gracias por todas las oportunidades que me habéis brindado.

A la Prof.^a Dra. M^a Àngels Sánchez Garcés le agradezco la idea del proyecto y sus enseñanzas en forma de consejos. Sin duda ha sido la líder de esta línea de investigación que me ha permitido tener un proyecto de tesis doctoral. Me gustaría agradecerle su capacidad de trabajo, su ilusión, su ética y su vehemencia en las cosas bien hechas. Pero por encima de esto, me gustaría agradecerle su confianza en mí. Un trabajo de investigación siempre empieza por una idea, que por muy buena que sea, si no se consiguen fondos económicos y no se tiene el capital humano suficiente, esa idea nunca se materializa. Por ello, agradezco a la Prof.^a Dra. M^a Àngels Sánchez Garcés por haber encontrado la financiación y a las personas necesarias para desarrollar este proyecto.

Al Prof. Dr. Cosme Gay Escoda, “el maestro de maestros”, uno de los investigadores españoles más influyentes a nivel nacional e internacional. Gracias por haberme inculcado la pasión por la Cirugía Bucal bajo el prisma de la cultura del esfuerzo y del trabajo duro. Por haber construido un equipo de Cirugía Bucal comprometido e

implicado con la investigación y la docencia. Por haber dedicado una vida a proteger el derecho de los Odontólogos a la Cirugía Bucal. Ha sido un honor para mí que haya podido codirigir la presente tesis doctoral. Gracias también por creer en mí, por su continua motivación y por sus ganas de potenciar a la gente joven.

Asimismo, agradezco al Prof. Dr. Eduard Valmaseda Castellón, Catedrático de la Universitat de Barcelona. Cualquiera que lo conoce se da cuenta muy pronto de sus extraordinarias capacidades intelectuales. Gracias por haber gestionado el proyecto competitivo, y por ayudarme en la preparación y redacción de los artículos. Él y el Prof. Dr. Rui Figueiredo, Profesor Agregado de la Universitat de Barcelona, me han enseñado los fascinantes mundos de la Metodología de la Investigación, la Cirugía Bucal y la Implantología Bucofacial. Gracias a ambos por sus consejos, sus ideas y su confianza. Ambos son una auténtica fuente de inspiración.

Al Dr. Octavi Camps Font, Profesor Asociado de la Universitat de Barcelona. Como al resto del equipo, lo conocí mientras estudiaba el Grado de Odontología y desde entonces ha sido profesor, compañero y ahora amigo. Gracias por acompañarme durante todo el camino de esta tesis doctoral. Su inestimable e incondicional ayuda ha sido muy importante.

Al Prof. Dr. Leonardo Berini Aytés, Profesor Titular de la Universitat de Barcelona. He coincidido únicamente tres veces con él, pero ha sido suficiente tiempo para darme cuenta de que son ciertos todos los elogios que se le atribuyen. Gracias por revisar y corregir el texto de esta tesis doctoral.

La sinergia entre las áreas básicas de conocimiento y las ciencias de la salud marcan las líneas de investigación del presente y del futuro. En este sentido, la presente tesis doctoral ha involucrado a un gran número de especialistas de distintas áreas como la

Metalurgia, la Química Analítica, la Ingeniería, la Biotecnología, la Anatomía Patológica, etc. De esta sinergia entre especialidades nace la colaboración con los equipos del Prof. Dr. Javier Gil Mur y la Prof.^a Dra. María Montes Bayón. Dos personas clave para el desarrollo de la presente tesis doctoral.

Mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. Javier Gil Mur, Catedrático de la Universitat Politècnica de Catalunya y de la Universitat Internacional de Catalunya, por su ayuda y sus ideas que han sido imprescindibles para este proyecto de tesis doctoral. Gracias por enseñarme el mundo de la implantología desde otro punto de vista y por tener el tiempo y la paciencia de ayudarme. Me gustaría agradecer de igual forma a su equipo por acogerme en sus instalaciones y por estar siempre disponibles cuando los he necesitado. A la Dra. Begoña M. Bosch y a la Dra. Leire Díez Tercero de la Universitat Internacional de Catalunya. A la Dra. Meritxell Molmeneu, el Dr. Miquel Punset y el Dr. Pablo Verdeguer de la Universitat Politècnica de Catalunya.

Al equipo de la Prof.^a Dra. María Montes Bayón, Catedrática de Química Analítica de la Universidad de Oviedo por mostrarse dispuesta a colaborar con nosotros y por su excelente trabajo. También debo agradecer a su equipo de Química Analítica de la Universidad de Oviedo, al Dr. Mario Corte Rodríguez, al Dr. Diogo Pompéu de Moraes y al Prof. Dr. Jörg Bettmer por su ayuda y dedicación.

Al Prof. Dr. Albert Soler i Gil, Catedrático de Geología de la Universitat de Barcelona, por su asesoramiento técnico y su ayuda en la liofilización de las muestras.

A la Dra. Samira Bakali y al Dr. Vicente Marco, médicos especialistas en Anatomía Patológica, por su trabajo en la realización del análisis histológico de las muestras.

Al equipo administrativo del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) por el asesoramiento y la ayuda en la gestión de la ayuda competitiva.

Si bien podría acabar los agradecimientos en este punto, no sería yo mismo si no guardaré un espacio a todas las personas que han complementado mi desarrollo personal y profesional.

A Eva Capdevila i Picanyol y a Rosa Rodríguez Ros. Gracias por vuestros consejos y por cuidar de todo el equipo, en los despachos de la Facultad y en el Hospital Odontològic de la Universitat de Barcelona.

A todos los profesores, compañeros y amigos del Máster de Cirugía Bucal e Implantología Bucofacial de la Universitat de Barcelona. Gracias por todos los momentos maravillosos que he vivido con vosotros y por ayudarme mientras hacía el trabajo experimental de esta tesis doctoral.

A mis amigos por tener la paciencia suficiente y por entender mis ausencias en alguna quedada. Habéis sido, sois y seréis una parte importante de mi vida.

A mi familia; mi madre Montse, mi padre Luís, mi hermana Paula. Por ser un pilar fundamental en mi vida. Gracias por entender mis necesidades e inquietudes, y por invertir en ellas. Cualquier agradecimiento se queda corto para vosotros.

A Sandra. La mejor compañera de viaje que podría tener. Gracias por estar siempre a mi lado. Gracias por apoyarme y por animarme cuando más lo he necesitado. Pero sobre todo gracias por entenderme como nadie lo hace. Tu cariño, paciencia y comprensión han sido fundamentales para mí y para el desarrollo de este trabajo.

Cualquiera que lea estas páginas se dará cuenta de lo afortunado que he sido por haber contado con todas estas excelentes personas. La aportación de todas ellas ha sido imprescindible por lo que espero que esta tesis doctoral sea un fiel reflejo de su altísimo nivel.

Os estoy profundamente agradecido a todos y todas.

Financiación

Los estudios que componen la presente tesis doctoral se han llevado a cabo gracias a la siguiente financiación:

Título: Efecto local y sistémico de las partículas de titanio en aleación liberadas durante la implantoplastia. Estudio experimental en ratas.

Organismo: Universitat de Barcelona

Convocatoria: XXII Convocatòria d'ajuts per a la recerca per a estudiants de doctorat i/o postgraus i màsters de la Unidad de Formación e Investigación de Odontología

Referencia: UP00OVPG

Duración: 2019-2020

Tutora: Prof.^a Dra. M^a Àngels Sánchez Garcés

Financiación: 4000 €

Título: Evaluación de la toxicidad de la implantoplastia para el tratamiento de la pérdida ósea en implantes dentales

Organismo: Instituto de Salud Carlos III

Convocatoria: Proyectos de Investigación en Salud

Referencia: PI20/01596

Duración: 2020-2023

IP: Prof. Dr. Eduard Valmaseda Castellón

Co-IP: Prof. Dr. Cosme Gay Escoda

Financiación: 38 720 €

Índice

1. LISTADO DE PUBLICACIONES INCLUIDAS EN LA TESIS DOCTORAL.....	35
2. RESUMEN	39
3. INTRODUCCIÓN	47
3.1. ANTECEDENTES DE LA IMPLANTOLOGÍA MODERNA.....	49
3.2. IMPLANTES DENTALES DE TITANIO.....	51
3.2.1. Generalidades.....	51
3.2.2. Propiedades mecánicas.....	51
3.2.3. Corrosión	54
3.2.4. Propiedades fisicoquímicas y topográficas.....	55
3.3. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LOS TEJIDOS PERIIMPLANTARIOS.....	59
3.4. REMODELADO ÓSEO PERIIMPLANTARIO	61
3.5. ENFERMEDADES PERIIMPLANTARIAS	66
3.5.1. Definiciones	66
3.5.2. Etiología	68
3.5.3. Factores e indicadores de riesgo.....	71
3.5.4. Características histopatológicas de la periimplantitis	72
3.5.5. Datos epidemiológicos.....	73
3.5.6. Diagnóstico	76
3.5.7. Tratamiento de las enfermedades periimplantarias.....	84
3.6. JUSTIFICACIÓN.....	97
4. HIPÓTESIS	101
5. OBJETIVOS.....	105

6. MATERIAL Y MÉTODO. RESULTADOS	109
ESTUDIO 1:.....	111
ESTUDIO 2:.....	145
ESTUDIO 3:.....	177
ESTUDIO 4:.....	207
ESTUDIO 5:.....	237
7. DISCUSIÓN	255
8. CONCLUSIONES	309
9. REFERENCIAS.....	313

Abreviaturas y símbolos

ε	Elongación máxima	BSP	Sialoproteína ósea
[]	Concentración	c	Constante
AAP	<i>American Academy of Periodontology</i>	c.p.	Comercialmente puro
AD	Asistido	C₆H₁₂O₆	Glucosa
AIM2	Ausente en el melanoma 2	CaCl₂	Cloruro de calcio
ALARA	<i>As Low As Reasonably Achievable</i>	CCR7	Receptor de quimiocinas C-C tipo 7
ALP	Fosfatasa alcalina	CD	Cúmulo de diferenciación
ANOVA	Análisis de la varianza	cDNA	ADN complementario
ARRIVE	<i>Animal research: Reporting of in vivo experiments</i>	CEEA	Comité Ético de Experimentación Animal
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>	Células I	Células inflamatorias
ATCC	Colección Americana de Cultivos	CHK2	Serina/treonina proteína cinasa
BET	Brunauer – Emmett – Teller	CLR	Receptores de lectina tipo C
BM-MSC	Célula madre mesenquimal derivada de la médula ósea	CO₂	Dióxido de carbono
BMP	Proteína morfogenética ósea	cps	Recuentos por segundo
BRCA1	Gen cáncer de mama 1	CR	Velocidad de corrosión
		Ct	Ciclo medio
		DAMPs	Patrones moleculares asociados a daños

DM	Diferencia de medias	ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco	El_{MÁX}	Límite elástico
DNA	Ácido desoxirribonucleico	E_{OCP}	Potencial de corrosión abierto
DNasa	Enzima que cataliza la rotura de los enlaces fosfodiéster en el DNA	Er: YAG	Erbio: Granate de itrio y aluminio
DOI	Identificador de objetos digitales	EW	Peso equivalente
DPBS	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco	FBS	Suero bovino fetal
DRX	Difracción de rayos X	fg	Femtogramo
dsDNA	DNA de doble cadena	G	Grado
DT	Desviación típica	GPa	Gigapascal
Dψ	Distancia interplanar	H	Dureza
e	Electrón	h	Profundidad de indentación
E	Módulo de Young	H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
EAO	<i>European Association for Osseointegration</i>	HE	Hematoxilina eosina
E_{CORR}	Potencial de corrosión	HF	Ácido fluorhídrico
EDS	Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva	HFF-1	Fibroblastos humanos
EE.UU.	Estados Unidos	HNO₃	Ácido nítrico
EFP	<i>European Federation of Periodontology</i>	IC 95 %	Intervalo de confianza del 95 %
		I_{CORR}	Intensidad de corrosión

ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente	LOD	Límite de detección
icr	Densidad de corriente crítica	LPS	Lipopolisacárido
IDIBELL	Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge	M	Molaridad
IFN-γ	Interferón gamma	m	Masa
IGF	Factor de crecimiento insulínico	M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
IL	Interleucina	m/z	Relación masa carga
IQR	Rango intercuartílico	M1	Macrófago con fenotipo proinflamatorio
ISO	Organización Internacional de Normalización	M2	Macrófago con fenotipo antiinflamatorio
ITI	<i>International Team for Implantology</i>	mA	Miliamperio
JCR	<i>Journal Citation Reports</i>	MgSO₄	Sulfato de magnesio
KCI	Cloruro potásico	mM	Milimolar
kDa	Kilodalton	MMPs	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
keV	Electronvoltio	mN	Milínewton
KH₂PO₄	Fosfato monopotásico	MNGC	Célula gigante multinucleada
kV	Kilovoltaje	MP	Partículas metálicas
LDH	Lactato deshidrogenasa	MPa	Megapascal
LO	Tasa de destilación más baja	mPER	Reactivo de extracción de proteínas de mamíferos
		MPO	Mieloperoxidasa
		mRNA	ARN mensajero

ms	Milisegundo	PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
mV	Milivolt	PBMCs	Macrófagos primarios extraídos de muestras de sangre
MW	Microondas	PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
MyD88	Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88	ppb	Parte por billón
Na₂HPO₄	Fosfato disódico	ppm	Parte por millón
NaCl	Cloruro sódico	ppt	Parte por trillón
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio	PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
NF-κβ	Factor nuclear kappa β	r.p.m.	Revoluciones por minuto
ng	Nanogramo	Ra	Rugosidad media aritmética
NLR	Receptores tipo NOD	RANK	Receptor activador del factor nuclear κ β
nm	Nanómetro	RANKL	Ligando RANK
NOD	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos	rhFGF	Factor de crecimiento fibroblástico recombinante
NOK-SI	Línea celular de queratinocitos orales humanos	rhIGF	Factor de crecimiento insulínico recombinante
NP	Nanopartículas	RIG-1/RLR	Receptores similares al gen inducible por el ácido retinoico 1
NR	No reportado	RNA	Ácido ribonucleico
OC	Osteocalcina		
OPG	Osteoprotegerina		
OR	Odds ratio		
Osteo	Medio osteogénico		

Rp	Resistencia de polarización	TCHC	Tomografía computarizada de haz cónico
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>	TCP	Poliestireno para cultivo de tejidos
RSD	Desviación típica relativa	TEM	Microscopio electrónico de transmisión
R_T	Tensión de rotura	TESPSA	Silano de anhídrido succínico trietoxisililpropilo
RTqPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	TFG-β	Factor de crecimiento transformante beta
Sa	Altura media aritmética	TFM	Tetrafluorometoxil
SAOS-2	Línea celular ósea	TGFβ	Factor transformante beta
SDS	Dodecilsulfato sódico	Th	Linfocitos T helper
SECIB	Sociedad Española de Cirugía Bucal	THP-1	Línea celular monocítica humana
SEM	Microscopía electrónica de barrido	Ti₂O	Monóxido de ditalio
SEPA	Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración	Ti₂O₃	Trióxido de ditalio
SFB	Suero fetal bovino	Ti6Al4V	90 % Ti – 6 % Al – 4 % V
SLA	Chorroado con arena de grano grueso y grabado ácido	TiNPs	Nanopartículas de Ti
SP-ICP-MS	ICP-MS de partícula única	TiO	Monóxido de Ti
SQ	Cuadrupolo único	TiO₂	Dióxido de Ti
St.	Saint	TLRs	Receptores tipo Toll
t	Tiempo de sorción	TNF	Factor de necrosis tumoral

TQ-ICP-MS	ICP-MS de triple cuadrupolo	W	Vatio
Tregs	Células reguladoras de los linfocitos T	Zr	Circonio
TRIF	Adaptador inductor de interferón- β con dominio TIR	η	Viscosidad del líquido
TRIS	Tris(hidroximetil)amino-metano	θ	Ángulo de contacto
UB	Universitat de Barcelona	μA	Microamperio
V	Voltaje	μM	Micromolar
v/v	Porcentaje volumen a volumen	μmHg	Micrómetro de mercurio
		ρ	Densidad del líquido
		σ	Tensión superficial
		Ω	Resistencia

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de los principales tratamientos superficiales utilizados en los implantes dentales.....	56
Figura 2. Unidad de remodelación ósea. Esta figura se generó utilizando Servier Medical Art.....	64
Figura 3. Imagen clínica de un implante con mucositis con ausencia de mucosa queratinizada.	67
Figura 4. Exploración radiográfica del mismo paciente con implantes dentales: A) ortopantomografía B) radiografía periapical.	81
Figura 5. Imagen clínica de dos defectos óseos periimplantarios.	81
Figura 6. Esquema de la clasificación de los defectos óseos periimplantarios descrita por Monje y cols. (218).	83
Figura 7. Imagen clínica de la explantación de un implante dental con el Implant Retrieval ® (Nobel Biocare ®, Kloten, Suiza).	86
Figura 8. Infografía de los distintos abordajes quirúrgicos de la periimplantitis (239).	87
Figura 9. Imagen clínica de dos implantes dentales a los que se les ha efectuado una implantoplastia. La flecha amarilla marca las partículas de Ti en el tejido conectivo, mientras que las flechas blancas señalan las zonas de difícil acceso en las que no se pudo realizar correctamente la implantoplastia.	88
Figura 10. Imagen clínica en la que se muestra como se insertan partículas metálicas de distinto tamaño en el hueso y en el tejido blando periimplantario después de la implantoplastia.....	91
Figura 11. Abordaje quirúrgico reconstructivo. Puede observarse que el defecto periimplantario tiene un predominante componente intraóseo.....	93
Figura 12. Abordaje transgingival después de una cirugía periimplantaria.	94

Figura 13. Cirugía periimplantaria combinada. Evaluación del defecto óseo después del legrado del tejido inflamatorio.	95
Figura 14. Secuencia quirúrgica de la cirugía combinada: A) desbridamiento del tejido de granulación e implantoplastia de la dehiscencia vestibular, B) relleno del defecto con un sustituto óseo de origen bovino, C) membrana de colágeno para cubrir el material óseo particulado.	96
Figura 15. Equipo de análisis de la superficie específica.	114
Figura 16. Equipo de análisis de la granulometría.	115
Figura 17. Microscopio electrónico de barrido.	116
Figura 18. Equipo de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).	117
Figura 19. Equipo de difracción de rayos X.	118
Figura 20. Cabinas de cultivo celular.	120
Figura 21. Distribución del tamaño de las partículas metálicas de la implantoplastia	123
Figura 22. Imágenes de microscopía electrónica bajo distintas magnificaciones: A) x50 y B) x150.	124
Figura 23. Curva de liberación de iones de Ti, Al y V en función del tiempo de exposición.	125
Figura 24. Espectro de difracción de rayos x de las partículas metálicas de la implantoplastia.	126
Figura 25. Representación de la sorción (aumento de masa en función del tiempo) de distintas muestras obtenidas a través de la implantoplastia de implantes dentales de Ti6Al4V.	126
Figura 26. Viabilidad celular en el ensayo de citotoxicidad con las células HFF-1 (A) y SAOS-2 (B). * Significa que la muestra tuvo efectos citotóxicos (< 70 % de la viabilidad celular).	127
Figura 27. Muestras preparadas para los ensayos de corrosión.	149

Figura 28. Potenciostato PARSTAT 2273.	150
Figura 29. Esquema del montaje del circuito eléctrico de tres electrodos y el equipo utilizado en los ensayos electroquímicos.	151
Figura 30. Representación esquemática de la extrapolación de las pendientes de Tafel.....	152
Figura 31. Imágenes de microscopía electrónica de barrido; A) Partículas de implantoplastia a una magnificación de x500, B) Microestructura de Widmanstätten de las partículas de la implantoplastia.....	154
Figura 32. Mapa de la distribución de la dureza de la zona interior del implante control (A); Mapa del módulo elástico de la zona interior del tornillo (B); Mapa de la dureza de la zona superficial del tornillo (C); Mapa del módulo elástico de la superficie del tornillo (D).....	155
Figura 33. Curvas de dureza y módulo elástico en función de la profundidad de indentación medidas sobre las partículas de la implantoplastia.....	156
Figura 34. Curvas del potencial de circuito abierto para el disco control (material de implante dental original) (A), y las muestras de implantoplastia (B).....	157
Figura 35. Curvas potenciodinámicas para el disco control (material original del implante dental) (A), y las muestras de implantoplastia (B).	158
Figura 36. Imágenes SEM de la superficie de los discos control (sin modificación de su superficie) (A) y de los discos de la implantoplastia (B). Las flechas señalan picaduras en la superficie de los discos que simulan la superficie de las partículas de la implantoplastia.....	159
Figura 37. Efecto de las partículas de Ti (A) y de Ti6Al4V (B) sobre la actividad metabólica de las células THP-1 después de 24 horas y 48 horas de cultivo. Los resultados de la actividad metabólica se representaron como porcentaje respecto a un control no estimulado (TCP) y se compararon con el TCP de cada día. Los valores de actividad metabólica < 80 % (línea roja) se consideraron citotóxicos. Las diferencias	

estadísticamente significativas con respecto al TCP ($p < 0.05$) se representaron con *.
 185

Figura 38. Efecto de la estimulación con extractos de Ti y de Ti6Al4V sobre la expresión génica de los marcadores proinflamatorios (TNF α , IL1 β y CCR7) y antiinflamatorios (IL10, TGF β y CD206) en la línea celular de macrófago THP-1. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representaron con * cuando la comparativa se hizo respecto al TCP y con el símbolo # cuando la comparativa se realizó respecto al Ti. 187

Figura 39. Efecto de la estimulación con extractos de Ti y de Ti6Al4V sobre la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL1 β) y antiinflamatorias (IL10) en la línea celular de macrófagos THP-1. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representaron con * cuando la comparativa se hizo respecto al TCP y con el símbolo # cuando la comparativa se realizó respecto al Ti. 188

Figura 40. Efecto de las partículas de Ti (A) y de Ti6Al4V (B) sobre la actividad metabólica de las células BM-MSCs después de 3 y 7 días de cultivo. Los resultados de la actividad metabólica se representaron como porcentaje respecto a un control no estimulado (TCP) y se compararon con el TCP cada día. Los valores de actividad metabólica $< 80\%$ (línea roja) se consideraron citotóxicos. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al TCP ($p < 0.05$) se representaron con *.
 189

Figura 41. Efecto de la estimulación con extractos de Ti y de Ti6Al4V sobre la expresión génica de los marcadores osteogénicos Runx2, ALP y OC en un cultivo primario de células mesenquimales humanas (BM-MSCs). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representaron con * cuando la comparativa se realizó respecto al control del medio osteogénico (Osteo) y con el símbolo # cuando la comparativa se hizo respecto al Ti. 190

Figura 42. Efecto de la estimulación con extractos de Ti y de Ti6Al4V sobre la actividad ALP en un cultivo primario de células mesenquimales humanas (BM-MSCs). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representaron con * cuando la comparativa se hizo respecto al TCP y con el símbolo # cuando la comparativa se realizó respecto al Ti.	191
Figura 43. Procedimiento quirúrgico. Anestesia inhalatoria (A), desinfección de la zona quirúrgica (B), incisión y disección (C), defecto óseo mandibular (D), relleno del defecto con partículas metálicas (E) y sutura (F).	212
Figura 44. Diagramas de caja de la concentración de Ti, Al y V en sangre (A) y órganos (B).	218
Figura 45. Reacción granulomatosa con presencia de histiocitos y células gigantes multinucleadas alrededor de las partículas metálicas. MNGCs: células gigantes multinucleadas; MP: partícula metálica; células I: células inflamatorias. Tinción de hematoxilina-eosina y aumento $\times 20$ (A). Pequeñas partículas metálicas en el citoplasma de las células gigantes multinucleadas (flechas). MNGCs: células gigantes multinucleadas; MP: partícula metálica; células I: células inflamatorias. Tinción de hematoxilina-eosina y aumento $\times 63$ (B). Hueso maduro desordenado con líneas de osificación irregulares correspondientes a un calo óseo de fractura. B: hueso. Tinción de hematoxilina-eosina y aumento $\times 10$ (C).	221
Figura 46. Fotografías que muestran (A) la suspensión resultante tras la digestión enzimática de una muestra de hígado utilizando el cóctel que contiene pancreatina y lipasa, y (B) la solución clara resultante obtenida tras la digestión enzimática utilizando proteinasa K y SDS en tampón Tris.	248
Figura 47. Señales brutas obtenidas para el Ti mediante el análisis SP-ICP-MS de agua ultrapura.	249
Figura 48. Señales brutas obtenidas para el Ti mediante el análisis SP-ICP-MS del blanco de la digestión enzimática. El histograma de la derecha representa la distribución de masas para cada muestra.	249

Figura 49. Señales brutas obtenidas para el Ti mediante el análisis SP-ICP-MS del hígado digerido enzimáticamente. El histograma de la derecha representa la distribución de masas para cada muestra.	250
Figura 50. Gráficos de caja que muestran la distribución de la masa de las partículas encontradas en la digestión del blanco y de las muestras de hígado, cerebro, bazo y pulmones. Para cada órgano, la primera caja corresponde a un control de la rata, y la segunda caja corresponde a una rata experimental.	251
Figura 51. Señal bruta obtenida para el Ti mediante el análisis SP-ICP-MS de la muestra de hígado con digestión enzimática y previamente enriquecida con nanopartículas estándar de TiO_2	252
Figura 52. Imágenes TEM para nanopartículas estándar de TiO_2 preparadas por suspensión de polvo de TiO_2 en agua purificada (A-C) y muestra de hígado digerida enzimáticamente (B-D).	253
Figura 53. Implantoplastia de dos implantes dentales que presentan un defecto óseo periimplantario supracrestal. Se puede observar como hay zonas donde no se consiguió hacer un correcto pulido del implante (A) y como la implantoplastia genera partículas metálicas que se liberan en la boca del paciente (B).	258
Figura 54. Imagen clínica de una cirugía resectiva periimplantaria (A). Se llevó a cabo la implantoplastia del componente supracrestal de los implantes (B). Se puede observar como hay numerosas partículas de metal en el interior del colgajo y en el hueso.	259
Figura 55. Imagen de microscopía electrónica de barrido a x 50 de aumento. Se puede observar que las partículas tenían distinto tamaño de partícula y una morfología irregular con forma de escamas.	263
Figura 56. Ecuaciones que representan la reacción básica de oxidación (A) y reducción (B). M: elemento químico; n: número; e: electrón.	269

Figura 57. Imagen radiográfica de un paciente con una prótesis total de cadera y de rodilla. Imagen cedida por el Dr. Sales.....	287
Figura 58. Imagen de una intervención quirúrgica para la retirada de una prótesis articular de cadera por metalosis. Se puede observar la tinción oscura de los tejidos que rodean la prótesis. Imagen cedida por el Dr. Babis.....	289
Figura 59. Imagen de una intervención en la que se retiró una prótesis total de cadera por metalosis. Se puede observar la tinción oscura de los tejidos circundantes a la prótesis (A) y la muestra retirada (B). Imagen cedida por el Dr. Sales.	290
Figura 60. Aflojamiento de la copa acetabular en una prótesis total de cadera. Imágen cedida por el Dr. Sales.	292

Índice de tablas

Tabla 1. Composición y propiedades mecánicas del Ti c.p. y de sus principales aleaciones utilizadas en implantología bucal	53
Tabla 2. Características fisicoquímicas más relevantes del Ti y su óxido.	56
Tabla 3. Clasificación de la rugosidad superficial de los implantes dentales según Albrektsson y Wennerberg (48,49).....	57
Tabla 4. Tratamiento superficial y rugosidad de los implantes dentales de las principales marcas comerciales y de los implantes dentales que se utilizaron en los estudios de la presente tesis doctoral.	59
Tabla 5. Prevalencia de la periimplantitis.....	75
Tabla 6. Criterios diagnósticos para las enfermedades periimplantarias. Tabla adaptada del trabajo de Berglundh y cols. (100).....	77
Tabla 7. Resultados de la superficie específica de la muestra de partículas metálicas de Ti6Al4V.	122
Tabla 8. Resultados de la granulometría.	122
Tabla 9. Composición química de la solución de Hank.....	150
Tabla 10. Resultados del ensayo de nanoindentación realizado sobre los implantes dentales. Los resultados están expresados con medias (desviación típica).....	154
Tabla 11. Propiedades mecánicas obtenidas por nanoindentación, y estrés residual determinado mediante difracción de rayos X. Los resultados están expresados con medias (desviación típica).	157
Tabla 12. Parámetros electroquímicos obtenidos mediante las curvas potenciodinámicas para las muestras control y de implantoplastia. Los resultados se expresan con medias (desviación típica).	158
Tabla 13. Secuencia de los cebadores empleados en el análisis de la expresión génica.	182

Tabla 14. Programa de microondas empleado para la digestión de las muestras. ...	215
Tabla 15. Resultados de la cuantificación de iones en sangre. Datos expresados con la mediana (IQR).	219
Tabla 16. Resultados de la cuantificación de iones en órganos. Datos expresados con la mediana (IQR).	220
Tabla 17. Programa de microondas utilizado para la digestión de las muestras.....	242
Tabla 18. Descriptores estadísticos de la distribución de la masa de los eventos encontrados en las muestras de hígado, cerebro, bazo y pulmones.	252
Tabla 19. Características de los implantes analizados en distintas publicaciones sobre la implantoplastia (362,363).	262

1. Listado de publicaciones incluidas en la tesis doctoral

La presente tesis doctoral, de acuerdo con el informe correspondiente autorizado por los directores de la tesis doctoral y el órgano responsable del programa de doctorado, se presenta como un compendio de trabajos previamente publicados. La tesis doctoral consta de cinco objetivos y las referencias completas de los cinco artículos que constituyen el cuerpo de la tesis doctoral son los siguientes:

1. **Toledano-Serrabona J**, Gil FJ, Camps-Font O, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ. Physicochemical and biological characterization of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: An in vitro study. Part I. Materials (Basel). 2021;14:6507.
 - 1) **Factor de impacto (2021):** 3.748
 - 2) **Posición JCR (Metallurgy & Metallurgical Engineering):** 18/79 (Primer cuartil).
2. **Toledano-Serrabona J**, Sánchez-Garcés MÁ, Gay-Escoda C, Valmaseda-Castellón E, Camps-Font O, Verdeguer P, Molmeneu M, Gil FJ. Mechanical properties and corrosion behavior of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: An in vitro study. Part II. Materials (Basel). 2021;14:6519.
 - 1) **Factor de impacto (2021):** 3.748
 - 2) **Posición JCR (Metallurgy & Metallurgical Engineering):** 18/79 (Primer cuartil).
3. **Toledano-Serrabona J**, Bosch BM, Díez-Tercero L, Gil FJ, Camps-Font O, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ. Evaluation of the inflammatory and osteogenic response induced by titanium particles released during implantoplasty of dental implants. Sci Rep. 2022;12:15790.
 - 1) **Factor de impacto (2021):** 4.996
 - 2) **Posición JCR (Multidisciplinary Sciences):** 19/73 (Segundo cuartil)

4. **Toledano-Serrabona J**, Camps-Font O, de Moraes DP, Corte-Rodríguez M, Montes-Bayón M, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ. Effects of titanium metal particles released during implantoplasty: An experimental study in rats. J Periodontol. 2022; Epub ahead of print.
 - 1) **Factor de impacto (2021):** 4.494
 - 2) **Posición JCR (Dentistry, Oral Surgery & Medicine):** 12/92 (Primer cuartil)

5. de Moraes DP, González-Morales S, **Toledano-Serrabona J**, Sánchez-Garcés MÁ, Bettmer J, Montes-Bayón M, Corte-Rodríguez M. Tracking nanoparticulated titanium released in-vivo from metal dental implant debris using (single-particle)-ICP-MS. 2022. Manuscrito en preparación.

2. Resumen

Título

Evaluación de la bioseguridad de la implantoplastia en el tratamiento de la periimplantitis

Introducción

La periimplantitis es una enfermedad inflamatoria altamente prevalente que afecta a los tejidos de alrededor de los implantes dentales. Cuando la superficie rugosa del implante se expone al medio bucal se ha propuesto la implantoplastia como una técnica de descontaminación mecánica que consiste en el pulido del componente supracrestal del implante dental. Durante este procedimiento se liberan partículas metálicas al entorno periimplantario cuyo efecto local y sistémico aún se desconoce.

Hipótesis

La hipótesis principal de esta tesis doctoral era que las partículas de Ti en aleación liberadas durante la implantoplastia no son seguras en el entorno periimplantario.

Objetivos

Los objetivos de este proyecto fueron: 1) Evaluar las características fisicoquímicas y la citotoxicidad de las partículas de Ti6Al4V liberadas durante la implantoplastia. 2) Determinar las propiedades mecánicas y la resistencia a la corrosión de los residuos metálicos de la implantoplastia. 3) Estudiar la respuesta inflamatoria que provocan las partículas de Ti c.p. y Ti6Al4V en un cultivo celular de macrófagos (THP-1), así como determinar la respuesta osteogénica mediante un cultivo de células madre mesenquimales humanas (BM-MSCs). 4) Analizar la reacción local de los tejidos que rodean las partículas de Ti en aleación insertadas en un defecto mandibular en rata. 5) Analizar la translocación de iones y nanopartículas de metal en sangre y en algunos órganos (cerebro, bazo, hígado y pulmones) después de insertar los residuos metálicos de Ti en aleación de la implantoplastia en un defecto mandibular en rata.

Material y Método

Mediante un protocolo de fresado estandarizado se recogieron partículas metálicas de Ti en aleación que se desprendieron durante la implantoplastia de implantes dentales. Estos residuos metálicos se utilizaron para llevar a cabo distintos trabajos:

Estudio 1. Caracterización fisicoquímica de la muestra obtenida. Se analizó la superficie específica, la granulometría, el ángulo de contacto, la nanodureza, la estructura cristalina, la morfología y el nivel de liberación de iones de las partículas metálicas de Ti6Al4V generadas durante la implantoplastia. Por otro lado, se evaluó su citotoxicidad determinando la viabilidad celular de fibroblastos y osteoblastos.

Estudio 2. Se evaluaron las propiedades mecánicas mediante nanoindentación y difracción de rayos X. Por otro lado, la resistencia a la corrosión se estudió mediante pruebas electroquímicas en un medio de saliva artificial. Se evaluaron los siguientes parámetros de corrosión: la densidad de corriente crítica (i_{cr}), el potencial de corrosión (E_{CORR}), y la intensidad de corrosión (I_{CORR}).

Estudio 3. Se hizo un ensayo de citotoxicidad para conocer la dilución considerada como no citotóxica y realizar los cultivos celulares en THP-1 y BM-MSC. Para determinar la respuesta inflamatoria, los extractos obtenidos fueron cultivados con macrófagos. Mediante RTqPCR se analizaron los genes CCR7, TNF α e IL1 β como marcadores pro-inflamatorios y CD206, TGF β e IL10 como marcadores anti-inflamatorios. Por otro lado, también se cuantificó la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α e IL1 β) y anti-inflamatorias (IL10) mediante kits de ELISA. La respuesta osteogénica se estudió con células mesenquimales humanas procedentes de la médula ósea. Los genes analizados fueron Runx2, fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC). Por último, se cuantificó la actividad de la fosfatasa alcalina mediante un método colorimétrico.

Estudios 4 y 5. Veinte ratas Sprague-Dawley se distribuyeron de forma aleatoria en tres grupos: un grupo experimental con un defecto mandibular relleno con partículas metálicas obtenidas por implantoplastia, un grupo control positivo con un defecto mandibular sin rellenar y un grupo control negativo. Treinta días después de la cirugía, se practicó la eutanasia de las ratas y se extrajo el tejido de alrededor del defecto mandibular, junto con los pulmones, el bazo, el hígado y el cerebro. Se recogieron dos muestras de sangre: inmediatamente antes de la cirugía y antes de la eutanasia. El tejido perilesional se analizó histológicamente utilizando la tinción de hematoxilina-eosina, y se midió mediante TQ-ICP-MS la concentración de iones de Ti, Al y V en sangre y órganos. Además, se evaluó la translocación de nanopartículas de Ti mediante el SP-ICP-MS.

Principales resultados

Estudio 1. Las partículas metálicas presentaron una morfología poliédrica con un valor medio de diámetro equivalente de 159 μm (rango 6-1850 μm) y una superficie específica de 0.3 m^2/g de promedio. La liberación de iones de V en la solución de Hank a 37 °C no mostró signos de estabilización y fue mayor que la de los iones de Ti y Al. Las partículas metálicas generadas por la implantoplastia presentaron una mayor dureza y módulo elástico en comparación con el implante dental. Por último, las partículas evaluadas tuvieron efectos citotóxicos sobre las células osteoblásticas y fibroblásticas humanas en el extracto completo, pero no en los extractos diluidos.

Estudio 2. Las partículas de implantoplastia mostraron una mayor dureza y módulo elástico, así como una menor deformación hasta la fractura y una tensión residual de compresión. La resistencia a la corrosión de las partículas de implantoplastia disminuyó y se observaron picaduras en la superficie.

Estudio 3. Los macrófagos estimulados con los extractos de Ti y Ti6Al4V mostraron un aumento de la expresión de TNF α y una disminución de la expresión de los genes anti-inflamatorios como TGF β y CD206. Comparativamente en los extractos con Ti6Al4V hubo una mayor expresión de TNF α y de IL10, así como una reducción en la expresión de los marcadores CCR7 y CD206. También se observó una mayor liberación de la citoquina IL1 β y una disminución en la liberación de IL10. Respecto a la respuesta osteogénica, los extractos Ti6Al4V causaron una disminución significativa en la expresión de Runx2 y OC en comparación al control y a los extractos de Ti. No hubo cambios relevantes en la actividad ALP.

Estudios 4 y 5. Todas las ratas con los residuos metálicos mostraron partículas metálicas y callo óseo en el defecto óseo. Las partículas metálicas estaban rodeadas por histiocitos y células gigantes multinucleadas, características de una reacción a cuerpo extraño.

El grupo experimental tuvo una concentración significativamente superior de iones Ti en todos los órganos excepto en el tejido pulmonar ($p < 0.05$). Además, en el grupo experimental hubo una mayor concentración de iones V en el cerebro ($p=0.008$). Se describió un protocolo de preparación de las muestras para optimizar la detección de nanopartículas. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimental y control, la mayor masa de las nanopartículas de Ti en el bazo y el cerebro de los animales de experimentación podría indicar que en el grupo experimental hubo nanopartículas de mayor tamaño.

Conclusiones

1. Los residuos metálicos liberados por la implantoplastia mostraron un tamaño, una superficie y una morfología irregular. La liberación de iones de V fue mayor que la de Ti y Al. Además, las partículas generadas por implantoplastia

produjeron una pérdida significativa de citocompatibilidad celular en osteoblastos y fibroblastos.

2. Las partículas de implantoplastia mostraron una mayor dureza y módulo elástico, así como una menor deformación hasta la fractura y una tensión residual de compresión. La resistencia a la corrosión de las partículas de implantoplastia disminuyó respecto a los discos control de Ti6Al4V sin implantoplastia y se observaron picaduras en la superficie de la muestra, lo que indica fenómenos de corrosión electroquímica.
3. Los ensayos celulares demostraron que los extractos con las partículas de Ti c.p. o de Ti6Al4V incrementaron la expresión de genes y citoquinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$) y redujeron la expresión de genes y citoquinas anti-inflamatorias (IL10). Además, los extractos Ti6Al4V provocaron una reducción de los marcadores osteogénicos Runx2 y OC.
4. Las partículas metálicas liberadas durante la implantoplastia inducen una reacción inflamatoria a cuerpo extraño caracterizada por la presencia de histiocitos y células gigantes multinucleadas alrededor de las partículas metálicas.
5. La presencia de las partículas metálicas de Ti generadas por implantoplastia elevó la concentración de iones metálicos en algunos órganos vitales de las ratas de experimentación. La contaminación de Ti procedente de fuentes ambientales dificultó la correcta determinación de las nanopartículas de Ti liberadas por los residuos metálicos de la implantoplastia. Sin embargo, la masa de Ti en los eventos obtenidos parece apuntar a la presencia de

nanopartículas de Ti de diferentes características en las muestras de cerebro y bazo en comparación con el control.

3. Introducción

3.1. Antecedentes de la implantología moderna

Uno de los avances más significativos de la Odontología moderna ha sido el desarrollo de la implantología bucal. El Profesor Per-Ingvar Brånemark de la Universidad de Göteborg descubrió accidentalmente la osteointegración del titanio (Ti) en el tejido óseo (1,2). A partir de este hallazgo, él y su equipo idearon un sistema de implantes dentales de Ti mecanizado comercialmente puro (c.p.) con forma roscada y con paredes paralelas. Tras comprobar su eficacia en estudios en perros, en 1965 se colocaron por primera vez cuatro implantes dentales endoóseos en la mandíbula de un paciente (1). Finalmente, en 1982 el Profesor Brånemark presentó los resultados clínicos a 15 años de seguimiento en la *Toronto Conference for Osseointegration in Clinical Dentistry* (3).

El concepto de osteointegración se describió en un primer momento como una unión directa entre el hueso y el implante dental vista bajo la luz de un microscopio óptico (4–6). Posteriormente este término se redefinió como una conexión directa estructural y funcional entre el hueso vivo, ordenado, y la superficie de un implante sometido a carga funcional (6). De forma paralela, Schroeder y cols. (7,8) publicaron las primeras imágenes histológicas de un implante osteointegrado y describieron esta unión como una “anquilosis funcional”.

Para Davies (9) el proceso biológico que ocurre después de la inserción de un implante dental se resume en tres fases de curación. En primer lugar, da comienzo la fase de osteoconducción que se caracteriza por la migración y el reclutamiento de células osteogénicas hacia la superficie del implante dental a través del coágulo de sangre. En segundo lugar, se mineraliza la matriz extracelular en un proceso conocido como formación ósea *de novo*. En este sentido, la osteointegración puede producirse a través de la osteogénesis de contacto, cuando la superficie del implante dental es

poblada por células óseas, o bien, a través de la osteogénesis a distancia, cuando el hueso se forma desde la superficie del tejido óseo existente hacia la superficie del implante. Finalmente, durante la fase de remodelación ósea se elimina el hueso reticular y se sustituye por hueso laminar (9). La remodelación ósea se basa en el balance entre la reabsorción y la aposición ósea y se explicará de una forma más precisa en apartados posteriores (10).

Con la incorporación de los implantes dentales osteointegrados se han podido elaborar prótesis que permiten restablecer la función y la estética de los pacientes edéntulos (11). Uno de los principios básicos descritos por el Profesor Brånemark para conseguir éxito en las rehabilitaciones bucales sobre implantes dentales era que éstos debían permanecer submucosos entre 3 y 6 meses durante el proceso de osteointegración pasiva (1). En esa época, se utilizaban implantes de Ti c.p. que tenían una superficie mecanizada, lo que confería una baja superficie de contacto entre hueso e implante. Con el objetivo de mejorar la estabilidad primaria y de acortar los tiempos de osteointegración, se introdujeron cambios en la macrogeometría y la microsuperficie del implante dental (12).

Actualmente el mercado de los implantes dentales se encuentra en un estado de continuo crecimiento y expansión (13). Según la organización *Grand View Research*, en 2019 éste tuvo un valor de 4.6 billones de dólares y se espera que crezca un 9 % entre los años 2020 y 2027. Europa es el continente que tiene la mayor actividad en este campo seguido de América del Norte y Asia. Las principales marcas comerciales del sector son Straumann® (Basel, Suiza), Nobel Biocare® (Kloten, Suiza), Dentsply® (Charlotte, EE.UU.), BioHorizons Camlog® (Alabama, EE. UU.) y ZimVie® (Florida EE. UU.) (14). Sin embargo, existen más de 600 sistemas de implantes dentales en el mundo de los cuales al menos 350 se comercializan en España.

3.2. Implantes dentales de titanio

3.2.1. Generalidades

Un implante dental es un dispositivo aloplástico que se inserta en el hueso y sirve como pilar de una prótesis (15). Los implantes dentales constan de tres partes bien diferenciadas que son: el cuello, el cuerpo y el ápice. Actualmente la mayoría de los implantes dentales tienen forma de tornillo y se diferencian entre sí por su macro y su microdiseño, es decir, por su forma y por su tratamiento superficial.

Generalmente los implantes dentales están hechos de Ti c.p., o bien, una aleación de éste como el titanio – zirconio (Ti-Zr) o el titanio – 6 aluminio – 4 vanadio (Ti6Al4V) (16,17). Aunque actualmente también se comercializan dispositivos implantológicos de dióxido de circonio, su uso está mucho menos extendido (18). Los implantes dentales deben presentar una alta resistencia a la fatiga, un bajo módulo elástico, una alta resistencia mecánica, una elevada resistencia a la corrosión y una excelente biocompatibilidad (19).

El Ti es un elemento químico que pertenece al grupo 4 de la tabla periódica. Es el séptimo metal más abundante de la corteza terrestre y se obtiene a partir de minerales ricos de óxido de Ti (TiO_2) como el rutilo y la ilmenita. Tiene un color gris y se considera un metal paramagnético, es decir, que no se imanta. Además, el Ti es un metal ligero (4.5 g/cm^3) que presenta una buena resistencia a la fatiga y una excelente tenacidad (19–21).

3.2.2. Propiedades mecánicas

El biomaterial ideal para ser usado como implante dental debe ser biocompatible y no tóxico, pero también debe tener unas determinadas propiedades mecánicas para

poder transmitir las cargas masticatorias sin romperse ni deteriorarse. Sin importar el material utilizado, un implante dental debe ser lo suficientemente resistente para soportar las cargas masticatorias del sistema estomatognático (22). Esto incluye fuerzas tensionales, de compresión, de torsión y de flexión (22,23). Además, estos dispositivos también deben resistir los mecanismos de fatiga, es decir, repetidos ciclos de carga de baja energía. Generalmente los mecanismos de fatiga son de un valor menor que los de una carga estática, sin embargo, suelen ser la causa más frecuente de fallo mecánico de los biomateriales dentales (24).

Las propiedades mecánicas del Ti c.p. para aplicaciones biomédicas están relacionadas con su grado de pureza. Según las normas internacionales (ISO5832-2, ASTM F67-00) existen cuatro grados de pureza del Ti c.p. (21,25). Los grados se clasifican en función de la cantidad de elementos intersticiales (O, N, C, H y Fe) que contiene. A medida que disminuye el grado de pureza, disminuye también la cantidad de elementos intersticiales por lo que empeoran las propiedades mecánicas (21). En la Tabla 1 se recoge la composición y las propiedades mecánicas más importantes de los distintos grados del Ti c.p. y de las aleaciones Ti6Al4V y Ti-15Zr.

El Ti c.p. sigue siendo el material más utilizado en el campo de la implantología bucal por las razones comentadas anteriormente. Sin embargo, algunas marcas comerciales fabrican implantes dentales con una aleación de Ti como el Ti6Al4V o el Ti-Zr. Estas aleaciones mejoran las propiedades mecánicas del Ti c.p. por lo que permiten utilizar implantes dentales de diámetro más estrecho incluso en zonas con mayor sobrecarga oclusal (25,26).

Las propiedades de los materiales dependen en gran medida de su estructura cristalina, es decir, de la manera en la que los átomos, iones o moléculas están distribuidos espacialmente (16). El Ti existe en dos formas cristalográficas. A

temperatura ambiente el Ti c.p. tiene una estructura hexagonal compacta (fase α), mientras que se transforma en estructura cúbica centrada en el cuerpo (fase β) cuando se alcanza los 882 °C. Los elementos de la aleación se clasifican como estabilizadores α o β ya que hacen disminuir o aumentar la temperatura para la transformación de α a β (27).

Tabla 1. Composición y propiedades mecánicas del Ti c.p. y de sus principales aleaciones utilizadas en implantología bucal

	Ti c.p. G1	Ti c.p. G2	Ti c.p. G3	Ti c.p. G4	Ti6Al4V G5	Ti-15Zr G5
Tipo de aleación						
	α	α	α	α	$\alpha + \beta$	α
Composición (% en peso)						
Ti	~ Resto	~ Resto	~ Resto	~ Resto	~ 90	~ 85
N	0.03	0.03	0.05	0.05	< 0.01	0.02
C	0.10	0.10	0.10	0.10	< 0.01	0.05
H	0.13	0.13	0.13	0.13	< 0.01	0.01
Fe	0.20	0.30	0.30	0.50	0.25	0.05
O	0.18	0.25	0.35	0.40	≤ 0.2	0.25
Al	-	-	-	-	~ 6	-
V	-	-	-	-	~ 4	-
Zr	-	-	-	-	-	~ 15
Propiedades mecánicas						
R _T (MPa)	240	345	450	550	900	970
El _{MÁX} (%)	24	20	18	15	10	12
ϵ (MPa)	170	275	380	483	800	850
E (GPa)	102	102	102	104	113	98

R_T: tensión de rotura; El_{MÁX}: límite elástico; ϵ : elongación máxima; E: módulo de Young.

Mientras que el Ti c.p. contiene únicamente la fase α , el Ti6Al4V es una aleación $\alpha + \beta$ que se estabiliza con Al y V. El Al eleva la temperatura de la transformación α a β , y el V la disminuye (16). Esta aleación tiene una composición química de 6 % de Al, 4 % de V, 90 % de Ti, y en menor medida elementos intersticiales como el O, el Fe, entre otros. Las aleaciones $\alpha + \beta$, como el Ti6Al4V, se caracterizan por presentar una mayor resistencia a la fatiga, un módulo elástico más bajo y una mayor ductilidad (27).

Existen otro tipo de aleaciones del Ti, como el Ti-Zr que es una aleación α con la que se consigue incrementar la resistencia mecánica (aumento de la dureza, resistencia a la tracción y resistencia a la flexión) y mejorar la resistencia al desgaste y a la corrosión (17,28).

3.2.3. Corrosión

El Ti, ya sea c.p. o en aleación, se ha utilizado y se sigue utilizando en multitud de aplicaciones biomédicas como, por ejemplo, en ortopedia, traumatología o implantología bucal (29). La razón fundamental por la que se utiliza el Ti como material para fabricar implantes dentales es que con él es posible alcanzar la osteointegración (30). Además, en la actualidad los implantes dentales de Ti están avalados por un gran número de publicaciones que han demostrado su eficacia para rehabilitar pacientes edéntulos incluso después de 30 años de función (31,32).

El Ti es un material altamente reactivo. Después de pocos milisegundos de exponerse al aire o al vapor de agua atmosférico se forma una capa de óxidos amorfos en la superficie del material de un grosor que oscila entre 1.5 y 10 nm (33). Esta película está compuesta principalmente de TiO_2 , aunque también se pueden encontrar otras formas de óxido de Ti como por ejemplo el Ti_2O , el TiO o el Ti_2O_3 (34,35). Este fenómeno de recubrimiento espontáneo por una película de óxido se conoce con el término de pasivación. A diferencia del Ti, el TiO_2 es un compuesto con una alta estabilidad química por lo que se considera bioinerte (36). De hecho, se ha estimado que el porcentaje de disolución del Ti de los implantes dentales es de aproximadamente 20 μm por año (37).

La capa de óxido proporciona una alta resistencia a la corrosión, y una excelente biocompatibilidad en los tejidos (38). Sin embargo, ningún metal es completamente bioinerte cuando se inserta en un organismo vivo (39). El TiO_2 puede degradarse producto del desgaste mecánico, de la corrosión, o bien, a través de una combinación sinérgica de ambos procesos (tribocorrosión) (40). En la mayoría de las ocasiones después de la pérdida de esta capa protectora de óxido, el Ti es capaz de re-pasivarse espontáneamente (38,41). No obstante, este proceso de re-pasivación no siempre es posible, ya que depende de la disponibilidad de oxígeno y de unas condiciones favorables (p.ej. angiogénesis y ausencia de inflamación) (41,42). Si el Ti no es capaz de recuperar la capa de óxido éste se vuelve más susceptible a sufrir fenómenos de corrosión (43). La degradación del metal por fenómenos corrosivos o por desgaste mecánico conlleva la liberación de iones y nanopartículas al entorno periimplantario que pueden llegar a diseminarse a regiones alejadas (44).

3.2.4. Propiedades fisicoquímicas y topográficas

En 1981 Albrektsson y cols. (6) describieron distintos factores que influyen sobre la osteointegración: el material del implante, el macro- y el micro- diseño, el estado del hueso receptor, la técnica quirúrgica y la carga del implante.

Las propiedades fisicoquímicas más relevantes de un implante dental son la composición química (composición atómica y estado químico de los elementos), la estructura cristalina, la textura o área específica, la rugosidad/porosidad, la forma, la energía libre superficial, la mojabilidad, la carga y potencial superficial, la elasticidad y la tensión residual. En la Tabla 2 se recogen algunas de las características fisicoquímicas más importantes del Ti y su óxido.

Tabla 2. Características fisicoquímicas más relevantes del Ti y su óxido.

Óxido más estable	TiO ₂
Punto isoelectrico	3.5 – 6.7
Carga a pH=7	Negativa
Solubilidad a pH=7	3×10^{-6}
Ángulo de contacto en agua	54
Energía libre superficial	50

Sin duda, la microtopografía (rugosidad superficial y textura) es una de las propiedades más relevantes del implante dental, ya que influye directamente en la calidad de la osteointegración, en el contacto hueso-implante y en la respuesta del organismo ante el dispositivo metálico (45).

Ya se ha mencionado que los primeros implantes dentales de Ti c.p. tenían una baja rugosidad superficial porque su superficie era mecanizada. Desde entonces, la industria de los implantes dentales ha ido incorporando distintos tratamientos de superficie con el objetivo de aumentar la rugosidad del implante dental mediante métodos de adición o de sustracción (Figura 1). Estas modificaciones superficiales mejoran la mojabilidad del material, incrementan el crecimiento y la proliferación celular, y acortan los tiempos de osteointegración (46,47).

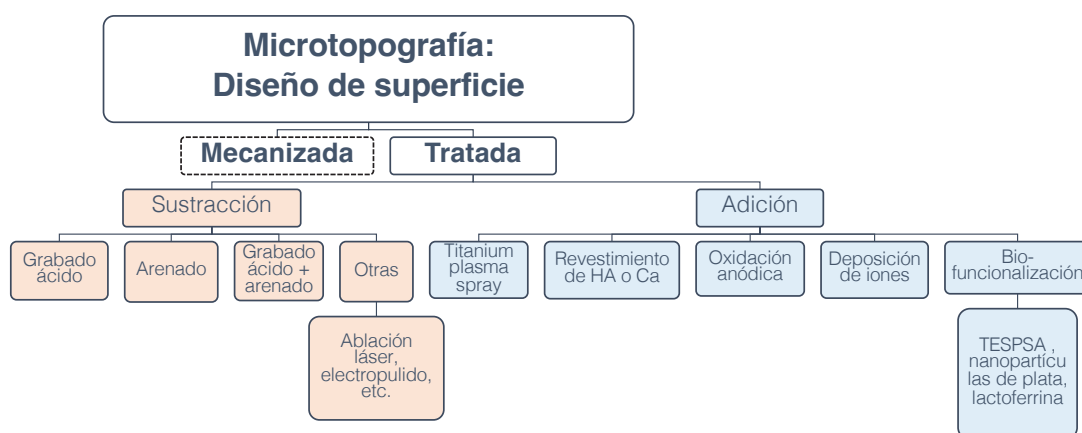


Figura 1. Esquema de los principales tratamientos superficiales utilizados en los implantes dentales.

Para el estudio de rugosidad de la superficie del implante se han utilizado parámetros bidimensionales como el R_a y parámetros tridimensionales como el S_a . Albrektsson y Wennerberg (48,49) publicaron una clasificación de la rugosidad superficial de los implantes dentales que se recoge en la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de la rugosidad superficial de los implantes dentales según Albrektsson y Wennerberg (48,49)

<i>Tipo de superficie</i>	<i>Valor S_a</i>
Lisa	$< 0.5 \mu\text{m}$
Mínimamente rugosa	$0.5 \text{ a } 1.0 \mu\text{m}$
Moderadamente rugosa	$1.0 \text{ a } 2.0 \mu\text{m}$
Rugosa	$> 2.0 \mu\text{m}$

Las técnicas de adición añaden material a la superficie del implante dental para aumentar su rugosidad. Aunque el *titanium plasma spray* o los recubrimientos de hidroxiapatita permitieron obtener superficies rugosas ($S_a > 2 \mu\text{m}$), no se consiguieron buenos resultados clínicos por lo que rápidamente cayeron en desuso (50). El desprendimiento de partículas y la posterior reacción a cuerpo extraño, o la colonización bacteriana por su elevada rugosidad superficial han sido las dos teorías más aceptadas para explicar el fracaso clínico de estas superficies (50–52). Es importante señalar que actualmente existen técnicas de adición más sofisticadas que permiten obtener superficies moderadamente rugosas ($S_a < 2 \mu\text{m}$) y con un tamaño de partícula mucho más fino (53). Sin embargo, siguen faltando ensayos clínicos que avalen su uso.

Por otro lado, las técnicas de sustracción se basan en procedimientos que eliminan material de la superficie del implante dental para aumentar su rugosidad superficial. Básicamente se utilizan el grabado ácido, el arenado o chorreado de partículas, o bien, una combinación de las dos técnicas anteriores (32,54–57). Tal y como se muestra en la Tabla 4, las principales marcas comerciales de implantes dentales

utilizan métodos substractivos para desarrollar sus superficies, excepto Nobel Biocare® (Kloten, Suiza).

Estos procesados de superficie también facilitan la adherencia y el depósito bacteriano causantes de las complicaciones biológicas de los implantes dentales como la periimplantitis y, además, dificultan la descontaminación de la superficie del implante (58,59). Existe cierta controversia acerca del impacto de las superficies moderadamente rugosas en la aparición de las enfermedades periimplantarias. Algunos estudios en modelo animal encontraron que la rugosidad del implante tenía un impacto en la progresión y el tamaño inicial de la lesión ósea periimplantaria (58–60). Sin embargo, una revisión sistemática de ensayos clínicos en humanos no encontró suficientes datos para correlacionar las enfermedades periimplantarias y las superficies implantológicas moderadamente rugosas (61).

Parece que el futuro y la innovación de los implantes dentales pasa por disponer de superficies biomiméticas, bioactivas, y con capacidad bactericida (62,63). En este sentido ya existen estudios in vitro y en modelo animal que evalúan tratamientos superficiales con capacidad bactericida como, por ejemplo, la incorporación de nanopartículas de Ag, o la biofuncionalización del Ti mediante compuestos orgánicos como el TESPSA (Triethoxysilylpropyl Succinic Anhydride Silane) (64–66). Lamentablemente, aún es un campo en desarrollo por lo que todavía no se comercializan estos dispositivos.

Tabla 4. Tratamiento superficial y rugosidad de los implantes dentales de las principales marcas comerciales y de los implantes dentales que se utilizaron en los estudios de la presente tesis doctoral.

Casa comercial	Superficie	Tratamiento	Rugosidad (S_a)
Straumann ®	SLA	Arenado y grabado ácido	1.3 μm
	SLA Active	Arenado y grabado ácido + Protección con N y almacenamiento en solución salina isotónica	1.6 μm
Nobel Biocare ®	TiUnite	Oxidación anódica	1.1 μm
	TiUltra	Oxidación anódica	Progresiva
Dentsply Sirona (AstraTech) ®	TiOblast	Arenado	1.1 μm
	Osseospeed	Arenado y grabado ácido	1.5 μm
	Osseotite	Doble grabado ácido	0.5 μm
ZimVie (Biomet 3i) ®	Nanotite	Arenado y doble grabado ácido + Deposición cristalina discreta con iones CaP	1.4 μm
Avinent ®	Biomimetic	Arenado y oxidación anódica	1.8 μm

3.3. Anatomía y fisiología de los tejidos periimplantarios

Las características de la mucosa periimplantaria se establecen después de la adaptación de los tejidos al componente transmucoso del implante. Durante esta fase de cicatrización se insertan los tejidos supracrestales (anteriormente conocido como establecimiento de la “anchura biológica”) que se componen por el epitelio de unión y el tejido conectivo. La integridad de este sellado mucoso es muy importante para conservar la osteointegración (67).

En la mucosa periimplantaria, igual que en el periodonto, se pueden encontrar tres estructuras epiteliales: el epitelio oral, el epitelio del surco y el epitelio de unión. El hueso alveolar y el epitelio oral están separados por el tejido conectivo subepitelial (68,69). El epitelio de unión tiene una longitud aproximada de 2 mm y las células más apicales se localizan a 1 - 1.5 mm coronales a la cresta ósea (70). Se ha comprobado que la maduración de la barrera epitelial se completa después de 6-8 semanas de curación (68).

A diferencia del periodonto, la mucosa periimplantaria tiene una mayor cantidad de fibras colágenas, aunque un menor número de fibroblastos. El tejido conectivo que rodea al implante dental está en contacto directo con la superficie de dióxido de Ti y contiene una densa red de fibras de colágeno que se originan en el periostio del hueso alveolar y se extienden hasta el margen mucoso. Las fibras de colágeno tienen una orientación circular y paralela a la superficie del implante o del aditamento (67,70,71). Según Tomasi y cols. (72) el sellado mucoso alrededor del implante dental finaliza transcurridas 8 semanas de curación.

La mucosa periimplantaria tiene unas dimensiones de entre 3 y 4 mm, con un epitelio largo de unión de aproximadamente 2 mm de longitud (73,74). Berglund y Lindhe (75) observaron que en zonas con una mucosa periimplantaria de menos de 2 mm ocurre un remodelado óseo como consecuencia de la inserción de los tejidos supracrestales. En esta línea, un metaanálisis publicado en el 2016 demostró que a corto plazo los implantes dentales colocados en una mucosa periimplantaria con unas dimensiones superiores a 3 mm tenían una pérdida ósea marginal radiográfica significativamente menor (DM= -0.8 mm, IC 95 % -1.18 a -0.42, $p < 0.0001$) (76).

La principal diferencia entre un implante dental y un diente es la ausencia de cemento radicular y ligamento periodontal. En consecuencia, en los implantes dentales no existen fibras de colágeno dentogingivales, no hay propiocepción y la vascularización es más pobre, ya que el aporte sanguíneo proviene únicamente de vasos supraparióísticos (77). Además, la superficie del implante dental está en contacto directo con el hueso y la dimensión de los tejidos supracrestales es mayor (aproximadamente 2 mm en dientes vs. 3.5 mm en implantes) (67).

De forma macroestructural el hueso se clasifica en cortical y esponjoso. El hueso cortical tiene una estructura compacta, poco vascularizada y pobre en poros donde las láminas óseas adoptan una morfología cilíndrica dispuesta concéntricamente unas dentro de otras (sistemas de Havers). Por otro lado, el hueso medular o esponjoso se caracteriza por ser mucho más vascularizado, y con las láminas óseas en forma plana o semilunar adoptando una disposición trabecular (9,78).

El hueso se considera un tejido dinámico, vascular y vivo que cambia a lo largo de la vida. A diferencia de los otros tejidos conectivos del cuerpo, las células óseas están embebidas en una matriz extracelular mineralizada (9). Este tejido óseo contiene células (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) y una matriz extracelular compuesta por un componente orgánico (colágeno y proteínas no colágenas) y un componente inorgánico (fosfato y carbonato de calcio) (78).

3.4. Remodelado óseo periimplantario

A pesar de que los implantes dentales han demostrado altos porcentajes de éxito para rehabilitar a los pacientes total o parcialmente edéntulos (79), pueden ocurrir complicaciones de diversa índole (80).

El fracaso del implante dental conlleva la pérdida de la osteointegración (81). Existen dos tipos de fracaso implantológico: fracaso temprano o tardío. Clásicamente el fracaso temprano se ha definido como la ausencia de osteointegración antes de la carga protésica. Sin embargo, cuando se emplean protocolos de carga inmediata, el fracaso temprano es aquel que sucede durante los primeros seis meses después de la colocación del implante. Por otro lado, el fracaso tardío se ha descrito como la pérdida del implante después de la conexión del aditamento y/o de la restauración. Es

importante mencionar que la periimplantitis representa la causa más frecuente de fracaso tardío implantológico (81).

También pueden ocurrir complicaciones que no implican el fracaso de la osteointegración, pero sí comprometen el éxito del tratamiento (82–86):

- Complicaciones mecánicas: fractura de la supraestructura, fractura del tornillo protético, aflojamiento del tornillo, etc.
- Complicaciones estéticas: recesión mucosa, transparencia metálica del implante, concavidades en zona estética, etc.
- Complicaciones biológicas: remodelado óseo periimplantario y enfermedades periimplantarias. Este apartado se desarrollará en profundidad en las próximas secciones.

Clásicamente, los autores han clasificado los implantes en tres estados diferentes: éxito, supervivencia y fracaso. El éxito del tratamiento implantológico siempre ha sido un tema controvertido, aunque muy relacionado con la pérdida ósea alrededor del implante. En 1986, Albrektsson y cols. (87) definieron el éxito del implante osteointegrado cuando existía una pérdida ósea menor a 1.5 mm alrededor del implante dental durante el primer año después de la carga protésica, y una pérdida ósea de menos de 0.2 mm anual después de este primer año. Desde entonces se han descrito otros criterios de éxito más estrictos (88–91), pero sigue existiendo una gran heterogeneidad entre los criterios de éxito/supervivencia reportados por los estudios primarios (90). Parece razonable afirmar que el éxito del tratamiento implantológico debe estar relacionado con factores dependientes del implante, del tejido blando periimplantario, de la prótesis y de la satisfacción del paciente (89).

El remodelado óseo alrededor del implante dental es un proceso continuo y coordinado que se basa en el equilibrio entre la reabsorción y la aposición ósea (92). La célula que se encarga de la regulación del remodelado óseo es el osteocito a través de un mecanismo de mecanotransducción (Figura 2).

La osteoclastogénesis se activa por la liberación de RANKL y M-CSF. El M-CSF es una glicoproteína homodimérica sintetizada por las células mesenquimales de la médula ósea y los osteoblastos. Induce la proliferación y supervivencia de los precursores de los osteoclastos y los macrófagos. El RANKL pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral y se expresa principalmente por los osteocitos, aunque también puede ser liberado por los osteoblastos y los linfocitos T. La unión del receptor transmembrana RANK con su ligando (RANKL) provoca la activación del osteoclasto. Paralelamente, el osteocito también libera esclerostina que bloquea la vía de señalización Wnt/ β -Catenin y como consecuencia se inhibe la proliferación osteoblástica y la mineralización de la matriz extracelular e incrementa la apoptosis de los osteoblastos (93–96).

La descalcificación y degradación de la matriz ósea producida por el osteoclasto provoca la secreción de distintos factores y citoquinas como, por ejemplo, BMPs, IGF y TFG β que regulan la función osteoblástica. La formación de hueso es un proceso regulado que se inicia con la diferenciación de las células osteoprogenitoras a preosteoblastos y posteriormente a osteoblastos maduros. Estos osteoblastos maduros segregan la matriz ósea extracelular que posteriormente se mineralizará. Es importante mencionar que a excepción de la osificación embrionaria intramembranosa, el hueso crece por aposición (9). Una vez se ha mineralizado la matriz extracelular, alrededor del 65 % de los osteoblastos sufren fenómenos de apoptosis, el 30 % se diferencian en osteocitos, mientras que el resto de osteoblastos se transforman en

células de recubrimiento óseo (97,98). Finalmente, los osteocitos y los osteoblastos regulan la reabsorción ósea mediante la secreción de osteoprotegerinas, un inhibidor natural del RANKL (99).

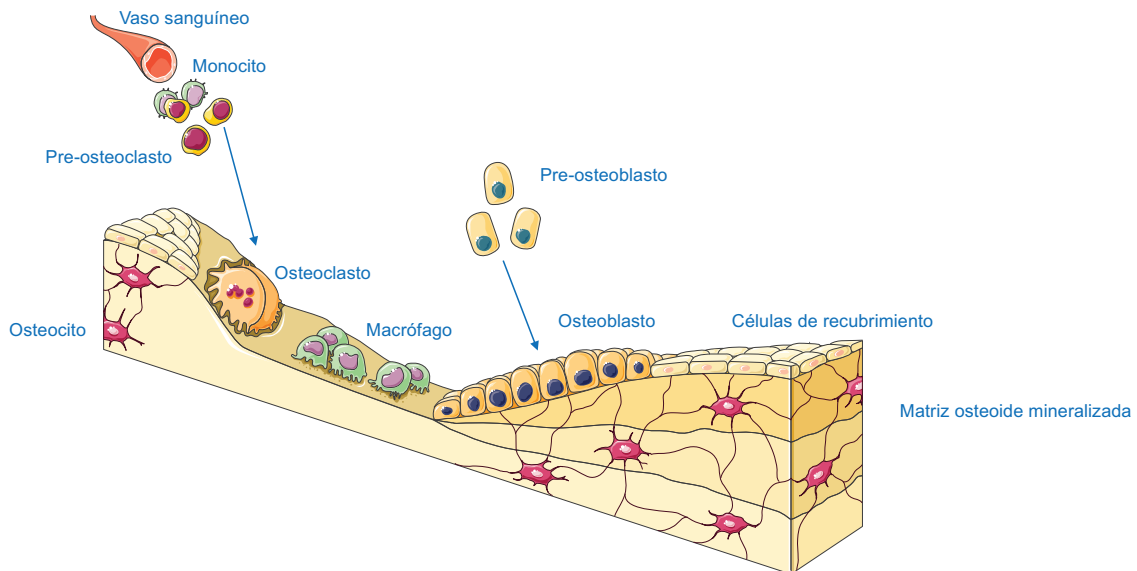


Figura 2. Unidad de remodelación ósea. Esta figura se generó utilizando Servier Medical Art.

Se debe diferenciar entre el remodelado óseo inicial o fisiológico alrededor del implante dental y la pérdida ósea periimplantaria progresiva asociada a patología conocida como periimplantitis (100). Una vez el implante dental se ha colocado y se expone a la cavidad bucal, se inicia un proceso de remodelado óseo fisiológico que permite el establecimiento de la inserción de los tejidos supracrestales (75). El remodelado óseo inicial alrededor del implante dental puede producirse en respuesta a los siguientes factores:

- Factores relacionados con la intervención quirúrgica: fresado del lecho del implante dental (101), malposición del implante (102–104), mucosa queratinizada (105–107), sustrato óseo (108–110), etc.

- Factores relacionados con el paciente: control de placa bacteriana (111), consumo de tabaco (112) y alcohol (112,113), polimorfismos genéticos (114–117), enfermedades sistémicas (118), etc.
- Factores relacionados con el implante y la prótesis: macro- y micro-diseño del implante (119), conexión implanto-protésica (120), diseño de la supraestructura protésica (121–123), sobrecarga oclusal (124), ajuste marginal (125), ausencia de micro-movimientos (126), altura del aditamento (127), etc. También se ha sugerido que las partículas/iones de Ti pueden desarrollar un remodelado óseo alrededor del implante dental en ausencia de bacterias (40,128).

Con el objetivo de disminuir el remodelado óseo inicial se han propuesto distintas estrategias como la utilización de implantes dentales con cambio de plataforma, aumentar el grosor de los tejidos blandos o el uso de pilares largos, entre otras (105,127,129,130). Sin embargo, ninguno de estos protocolos ha logrado ser completamente exitoso para prevenir esta pérdida ósea inicial (131).

Según un reciente estudio de casos y controles parece no existir una asociación estadísticamente significativa entre el remodelado óseo inicial y la incidencia de periimplantitis (131). No obstante, la periimplantitis se caracteriza por presentar una pérdida ósea progresiva alrededor del implante dental por lo que se ha sugerido que el remodelado óseo inicial debe ser el preludio de esta entidad (76).

Resulta importante destacar que, aunque la pérdida ósea marginal no siempre cursa con periimplantitis, no puede existir periimplantitis sin que no haya una pérdida de hueso alrededor del implante. En esta línea, Galindo-Moreno y cols. (91) demostraron que el 96 % de los implantes dentales que presentaban una pérdida ósea marginal > 2 mm a los 18 meses tenían una pérdida ósea marginal de al menos 0.44 mm a los 6 meses post-carga protésica. Dicho de otro modo, los implantes que perdían más

hueso en etapas iniciales mostraban una mayor pérdida de hueso en el futuro, y un mayor riesgo de fracaso. Sin embargo, este estudio únicamente analizó implantes dentales que estaban colocados en la región posterior del maxilar superior. Este hecho limita la extrapolación de sus resultados ya que se ha sugerido que la pérdida ósea marginal alrededor del implante podría ser diferente en función de su localización en la cavidad bucal (132,133). Recientemente el mismo grupo de investigación publicó un estudio con un diseño similar, pero en el que se evaluaron implantes dentales colocados en cualquier localización de la boca (134). Los autores observaron que los implantes que perdían más hueso eran los que presentaban una pérdida ósea marginal > 0.48 mm a los 6 meses después de la carga protésica. De hecho, establecieron que una pérdida ósea marginal radiográfica post-carga de 0.5 mm era la línea roja que distinguía entre un remodelado óseo fisiológico y el desarrollo de patología, y que podía ser usado como criterio de éxito implantológico.

3.5. Enfermedades periimplantarias

Miembros de la *American Academy of Periodontology* (AAP), de la *European Federation of Periodontology* (EFP) e investigadores externos se reunieron en el año 2017 para definir la salud periimplantaria (73), la mucositis periimplantaria (135) y la periimplantitis (136). Este documento de consenso fue publicado un año más tarde en el 2018 y dio lugar a varias publicaciones (73,100,135–138).

3.5.1. Definiciones

La salud periimplantaria se caracteriza por la ausencia de eritema, sangrado al sondaje, inflamación y supuración. En salud no debe haber un incremento de la profundidad de sondaje en comparación con registros previos, ni pérdida ósea

radiográfica progresiva alrededor del implante dental. Es importante destacar que puede existir salud periimplantaria en implantes con un soporte óseo reducido (73).

Por otro lado, las enfermedades periimplantarias se clasifican en mucositis periimplantaria y periimplantitis siendo ambas, entidades inflamatorias inducidas por placa bacteriana que afectan a los tejidos que rodean los implantes dentales. En la periimplantitis, a diferencia de la mucositis, los signos inflamatorios se asocian a una pérdida ósea progresiva (135,139).

Se asume que la mucositis periimplantaria es la entidad previa a la periimplantitis; sin embargo, aún no se han identificado los factores por los que la mucositis periimplantaria evoluciona hacia la periimplantitis (135) (Figura 3).



Figura 3. Imagen clínica de un implante con mucositis con ausencia de mucosa queratinizada.

3.5.2. Etiología

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la última clasificación de las enfermedades periimplantarias únicamente reconoce la placa bacteriana como único agente etiológico (100). Sin embargo, existen autores que han sugerido que la inflamación de la mucosa y la pérdida ósea periimplantaria se debe a una reacción a cuerpo extraño no dependiente de bacterias (140).

Etiología bacteriana

El campo de la Microbiología ha experimentado un desarrollo exponencial en los últimos años con la incorporación de las técnicas de secuenciación, metagenómica, y las ciencias “-ómicas”. En 2008 se desarrolló el Proyecto Microbiano Humano por el Instituto Nacional de Salud de los EE.UU. con el objetivo de identificar y caracterizar los microorganismos del cuerpo humano asociados a salud y a enfermedad (141). También existe la base de datos *expanded Human Oral Microbiome Database V3* (<https://www.homd.org/>) que recoge información exhaustiva sobre las bacterias de la boca y de las estructuras circundantes como la faringe, las fosas nasales, los senos paranasales y el esófago.

La cavidad bucal es un ambiente propicio para el crecimiento bacteriano ya que es un entorno húmedo con una temperatura de aproximadamente 37 °C y con distintas zonas donde las bacterias pueden crecer (p.ej. dientes, mucosas, lengua, implantes dentales, etc.) (142). Según los datos del Proyecto Microbiano Humano aproximadamente el 25 % de todas las bacterias del cuerpo se localizan en la boca (143). Actualmente, se han identificado más de 700 especies bacterianas orales algunas de las cuales solo se conocen como filotipos bacterianos aún no cultivados (142). Se estima que la saliva contiene $10^8 - 10^9$ bacterias por mL; algunas de éstas

se adhieren a los dientes o a los componentes del implante dental iniciándose así la formación de un biofilm (144).

Un biofilm se define como un co-agregado de microorganismos que crecen embebidos en una matriz extracelular y que están adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo. Está compuesto principalmente por bacterias pero también se pueden encontrar virus, hongos o protozoos (141). Este co-agregado de microorganismos se puede formar a partir de una célula planctónica o a partir de un biofilm ya existente. En el primer caso, después de la formación de la película adquirida en la superficie de los dientes o de los materiales dentales, los colonizadores primarios (p.ej. *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, etc.) crean filamentos proteicos que permiten la adhesión de los colonizadores tempranos. Posteriormente se unen los colonizadores secundarios y tardíos hasta crear un biofilm maduro (144–146).

La microbiota comensal juega un papel fundamental para el mantenimiento de la salud bucal ya que impide la colonización de microorganismos patógenos exógenos. Sin embargo, puede ocurrir un desequilibrio entre la microbiota comensal y la respuesta del hospedador. Este fenómeno se conoce como disbiosis e implica la aparición de enfermedades, como por ejemplo, la periodontitis, la periimplantitis o la caries (147).

La periimplantitis se caracteriza por presentar una microbiota mixta, variable y en muchos casos dominada por bacterias Gram negativas como el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* y la *Tannerella forsythia*, entre otras (148). La distribución de las especies bacterianas detectadas no difiere mucho según el estado clínico del implante (149). Sin embargo, sí que se ha observado que, en comparación con los sitios sanos, en la periimplantitis hay un mayor recuento de 19 especies bacterianas (150). Además, en comparación

con la periodontitis, en las lesiones periimplantarias también se han identificado un mayor número de patógenos oportunistas, hongos y virus (151–155).

Se ha establecido que la patogénesis de la periodontitis y la periimplantitis es la misma. De este modo, el acúmulo de un biofilm disbiótico desarrolla un proceso inflamatorio que induce a la reabsorción ósea mediante la activación de los osteoclastos (92,156).

Etiología no bacteriana

El organismo humano puede reaccionar de cuatro formas después de que se coloque un implante: rechazo, disolución, reabsorción y demarcación. De este modo, los implantes que se colocan en el hueso están demarcados por tejido óseo (157,158). Para Albrektsson y cols. (159,160) la osteointegración es una reacción a cuerpo extraño que se caracteriza por la formación de hueso alrededor del implante dental como una reacción de defensa. Esta definición hace especial énfasis en la interacción entre el sistema inmunitario y el cuerpo extraño.

La pérdida del equilibrio entre la respuesta inmune del hospedador y el cuerpo extraño provoca la pérdida ósea marginal periimplantaria o incluso el fracaso del implante. El mecanismo patogénico exacto que explica esta pérdida ósea aún no se conoce por completo; sin embargo, parece que las partículas de Ti o los restos de cemento pueden romper este equilibrio (160,161). Diversos autores han sugerido que la inflamación y la pérdida ósea alrededor del implante no son procesos dependientes exclusivamente de bacterias (162–165). De hecho, estos investigadores rechazan que las enfermedades periimplantarias tengan la misma etiología que las enfermedades periodontales (infección provocada por bacterias), mientras que encuentran grandes

similitudes entre la pérdida ósea aséptica que se produce en las artroplastias totales de cadera con la pérdida ósea alrededor de los implantes dentales (160).

3.5.3. Factores e indicadores de riesgo

En el citado documento de consenso también se recoge una serie de factores e indicadores de riesgo relacionados con las enfermedades periimplantarias (166). En primer lugar, se debe distinguir entre un factor de riesgo y un indicador de riesgo.

- Factor de riesgo: Factor biológico, ambiental, de comportamiento confirmado por una secuencia temporal, frecuentemente en estudios longitudinales, que si está presente aumenta directamente la probabilidad de que ocurra una enfermedad y, si está ausente o se elimina, reduce esa probabilidad. Para determinar un factor de riesgo se requieren estudios prospectivos.
- Indicador de riesgo: Se ha asociado con la enfermedad, pero no se ha establecido como factor de riesgo. Se obtiene a partir de estudios transversales o estudios retrospectivos.

Los factores que se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar periimplantitis son la mala higiene oral, la falta de adhesión a un programa de mantenimiento periimplantario y la historia previa de periodontitis (136). En cambio, los indicadores de riesgo de la periimplantitis son el tabaco, la diabetes, la cantidad de mucosa queratinizada, los polimorfismos genéticos, el exceso de cemento, la sobrecarga oclusal, los factores iatrogénicos y las partículas de titanio (136).

3.5.4. Características histopatológicas de la periimplantitis

Múltiples estudios han analizado las características histopatológicas de la periimplantitis y las han comparado con la periodontitis o la mucositis periimplantaria (167–171).

Se ha sugerido que la etiopatogenia de la periimplantitis es la misma que la de la periodontitis. Ambas lesiones comparten características clínicas como por ejemplo la inflamación de la mucosa o la pérdida de hueso de soporte. Sin embargo, diversas publicaciones han reportado importantes diferencias en sus características histopatológicas, hecho que podría explicar las disimilitudes en el inicio y en la progresión de ambas entidades (167–172).

Carcuac y cols. (172) llevaron a cabo un estudio experimental en perros labrador y reportaron que las lesiones periimplantarias eran considerablemente más grandes, tenían una extensión más cercana al hueso y contenían un mayor número de osteoclastos que las lesiones periodontales. No obstante, existe cierta controversia acerca del modelo experimental de periimplantitis provocada por ligadura periimplantaria. Si bien es cierto que en los dientes la ligadura produce una lesión periodontal autolimitada, en los implantes dentales provoca una lesión con una progresión rápida y no controlada (168). La respuesta del hospedador podría explicar la distinta progresión entre ambas enfermedades (173). Por estas razones, algunos autores han sugerido que este modelo de ligadura no es válido para estudiar la periimplantitis y debería ser revaluado (174).

En una revisión de Berglundh y cols. (168) se compararon las características histopatológicas entre las lesiones periodontales y periimplantarias. Los autores describieron que la extensión apical del infiltrado inflamatorio era más pronunciada en

la periimplantitis, y que además este infiltrado inflamatorio se localizaba en la mayoría de los casos apical al epitelio de la bolsa. Carcuac y Berglundh (167) en un estudio más reciente concluyeron que las lesiones periimplantarias son el doble de extensas (3.5 mm^2 periimplantitis y 1.5 mm^2 periodontitis), y que contienen un mayor número de CD138, CD68 y MPO en comparación con las lesiones periodontales. Además, en la periimplantitis se ha encontrado una mayor proporción de superficie, número y densidad de células plasmáticas, macrófagos y neutrófilos, así como una mayor densidad de estructuras vasculares en el exterior del infiltrado celular (167). Esto difiere con los resultados de otros autores que encontraron que el porcentaje y la distribución de las células inflamatorias fue similar entre las muestras de periimplantitis y periodontitis (150,170). Estas diferencias se pueden explicar por diversos factores de confusión, como la situación clínica del paciente entre los distintos estudios, el tiempo de evolución de la lesión periimplantaria, el tamaño de la biopsia de los tejidos, etc. (170).

Por otro lado, se ha observado que las lesiones de periimplantitis son más extensas y presentan un mayor número de neutrófilos y de inmunoglobulina CD19+ en comparación con la mucositis periimplantaria (175).

3.5.5. Datos epidemiológicos

Las enfermedades periimplantarias afectan a un gran número de pacientes portadores de implantes dentales. De hecho, la alta prevalencia de la periimplantitis ha provocado un gran interés en la comunidad científica odontológica (176).

Tal y como se puede observar en la Tabla 5, la prevalencia de periimplantitis reportada por los estudios primarios, aunque es generalmente alta, varía considerablemente entre los trabajos publicados. Se debe tener en cuenta que estos estudios se llevaron

a cabo en distintos países y ambientes clínicos (clínica privada vs. clínica universitaria), utilizaron diferentes criterios para definir la periimplantitis y no todos evaluaron el mismo tiempo de seguimiento (177–180). En resumen, existen distintas razones que explican porque la prevalencia de periimplantitis difiere considerablemente entre los estudios.

En España se ha evaluado la prevalencia de la periimplantitis en varias publicaciones (181–185). Mir-Mari y cols. (185) reportaron que el 16.3 % de los pacientes con implantes dentales de una consulta privada tenían periimplantitis. Estos resultados pueden no ser extrapolables a la población española ya que toda la muestra de pacientes estaba incluida en estrictos programas de mantenimiento. Unos años más tarde un equipo de la Sociedad Española de Periodoncia (SEPA) elaboró un estudio multicéntrico y reportaron que el 24 % de los españoles con implantes sufrían periimplantitis (183). Sin embargo, los resultados de este trabajo pueden estar sesgados ya que los datos se recogieron por un grupo de dentistas centinela y el diagnóstico de la enfermedad se llevó a cabo sin registros basales periimplantarios. El estudio más reciente en población española es el de Romandini y cols. (184). Los autores publicaron que la prevalencia de periimplantitis es superior al 50 % y que la mayoría de los pacientes tenían afectados más de dos implantes. Estos resultados probablemente se deban a que se recogieron datos de pacientes tratados en un ambiente universitario y en una unidad de Periodoncia, es decir, con antecedentes de periodontitis. También es posible que, tal y como veremos más adelante, los parámetros diagnósticos actuales sobreestimen la presencia de enfermedad (134).

Tabla 5. Prevalencia de la periimplantitis

Estudio	Población	Año	Diseño del estudio	Implantes %	Pacientes %
Aguirre-Zorzano y cols. (181)	España	2015	Transversal	9.8	15.1
Canullo y cols. (182)	España	2015	Transversal	7.3	9.9
Casado y cols. (186)	Brasil	2013	Transversal	NR	30.1
Cecchinato y cols. (187)	Italia	2013	Transversal	NR	7.0
Dalago y cols. (124)	Brasil	2016	Transversal	7.3	16.4
Daubert y cols. (188)	EE.UU.	2015	Transversal	16.0	26.0
Derks y cols. (189)	Suecia	2016	Transversal	8.0	14.5
Derks y Tomasi (177)	-	2015	Revisión sistemática y metaanálisis	NR	22.0
Dvorak y cols. (190)	Austria	2011	Transversal	13.3	23.7
Ferreira y cols. (191)	Brasil	2006	Transversal	7.4	8.9
Fransson y cols. (192)	Suecia	2010	Transversal	12.4	27.8
Koldslund y cols. (193)	Noruega	2010	Transversal	12.5	21.2
Konstantinidis y cols. (194)	Grecia	2015	Transversal	6.2	12.9
Lee y cols. (178)	-	2017	Revisión sistemática y metaanálisis	9.3	19.8
Marrone y cols. (195)	Bélgica	2013	Transversal	23.3	36.9
Máximo y cols. (196)	Brasil	2008	Transversal	7.5	12.4
Mir-Mari y cols. (185)	España	2012	Transversal	9.1	16.3
Papi y cols. (197)	Italia	2019	Transversal	26.3	36.9
Rakic y cols. (179)	-		Revisión sistemática y metaanálisis	12.8	18.5
Rodrigo y cols. (183)	España	2018	Transversal	20.0	24.0
Romandini y cols. (184)	España	2020	Transversal	27.9	56.6
Vignoletti y cols. (198)	Italia	2019	Transversal	17.1	35.0
Zetterqvist y cols. (199)	Multicéntrico	2015	Ensayo clínico	0	1

3.5.6. Diagnóstico

El diagnóstico de las enfermedades periimplantarias se basa en la exploración clínica y radiológica. Se debe valorar la presencia de placa bacteriana, enrojecimiento mucoso y sangrado espontáneo. Adicionalmente, se deben explorar los parámetros de sangrado y supuración al sondaje, profundidad de sondaje y pérdida ósea radiográfica progresiva (138). En la Tabla 6 se recogen los criterios diagnósticos actuales para la salud y las enfermedades periimplantarias.

En base al documento de consenso entre la EFP y la AAP se puede diagnosticar la periimplantitis a partir de registros basales post-carga funcional del implante dental o bien, a través de una “evidencia indirecta”. En el primer caso, debe existir sangrado y/o supuración al sondaje, profundidad de sondaje aumentada en comparación con registros previos, y pérdida ósea progresiva evidenciada a partir de radiografías (138). Cuando no disponemos de registros periimplantarios previos, debe haber sangrado y/o supuración al sondaje combinado con profundidad al sondaje igual o superior a 6mm y una pérdida ósea radiográfica de 3 mm respecto a la porción intraósea más coronal del implante dental (138).

Esta definición de periimplantitis sin registros de pérdida ósea progresiva puede conducir a errores diagnósticos graves (134). Por ejemplo, los implantes que tienen 3 mm o más de pérdida ósea marginal con mucositis serán clasificados de periimplantitis, hecho que condicionará el plan de tratamiento. En esta línea, Romandini y cols. (200) observaron que la definición de periimplantitis en ausencia de registros previos propuesta en el documento de consenso entre la EFP y la AAP tenía una baja sensibilidad, lo que significa que no se consigue clasificar correctamente a un individuo enfermo.

La importancia del sondaje de los implantes dentales radica en observar cambios en la profundidad de sondaje en comparación con visitas previas y detectar cambios inflamatorios en la mucosa periimplantaria como sangrado o supuración. Para sondear los implantes se utiliza la misma técnica que en los dientes; sin embargo, la interpretación de los resultados es distinta debido a las diferencias anatómicas entre ambos.

Tabla 6. Criterios diagnósticos para las enfermedades periimplantarias. Tabla adaptada del trabajo de Berglundh y cols. (100)

		Salud periimplantaria	Mucositis periimplantaria	Periimplantitis
Signos radiográficos	Pérdida ósea radiográfica	-*	-*	+**
Signos clínicos	Sangrado al sondaje	-	+	+
	Supuración	-	+/-	+/-
	Signos visuales de inflamación	-	+/-	+/-
	Profundidad de sondaje (comparado con registros basales)	***	+/-	+**

+ Presente

- Ausente

+/- Puede estar presente

* Un soporte óseo reducido alrededor de los implantes dentales es compatible con salud o mucositis periimplantaria.

** En ausencia de registros previos la periimplantitis se define como sangrado al sondaje, profundidad de sondaje igual o superior a 6mm y una pérdida ósea radiográfica igual o superior a 3mm.

*** No es posible establecer un rango de profundidades de sondaje para la salud periimplantaria.

Existen distintos factores que tienen un impacto evidente sobre la profundidad de sondaje de los implantes dentales como, por ejemplo, la fuerza empleada durante el sondaje, la anchura y angulación de la sonda, el sondaje repetido en una zona del implante, la posición apicocoronal del implante, la inflamación de los tejidos periimplantarios, la presencia de un diente natural adyacente, el diseño del implante, o la presencia de la prótesis (73,201–204). Todos estos factores, junto con las

diferencias anatómicas entre dientes e implantes, han hecho que algunos autores hayan sugerido que la profundidad de sondaje no debe ser indicativa de enfermedad periimplantaria (203).

Sondar o no los implantes dentales ha sido un tema controvertido en la literatura (204). Actualmente no disponemos de un valor de profundidad de sondaje alrededor de implantes dentales que implique patología (73). Algunos autores no recomiendan sondar los implantes para no romper el sellado entre el tejido blando y el aditamento, que podría inducir a inflamación y reabsorción ósea (203). Sin embargo, se ha comprobado que el sellado mucoso se reestablece transcurridos los cinco días después del sondaje (205). En este sentido, diversos estudios han demostrado el valor predictivo de la profundidad de sondaje en el diagnóstico de la periimplantitis. Parece que existe una correlación positiva entre la profundidad de sondaje y la pérdida ósea alrededor del implante (204–207).

El valor diagnóstico del sangrado al sondaje alrededor de los implantes también ha suscitado una gran controversia (208). Este parámetro clínico puede deberse al traumatismo provocado por aplicar fuerzas excesivas durante la exploración del implante dental, o bien por la patología de los tejidos periimplantarios (208). Se ha sugerido que la fuerza necesaria para sondar un implante es de 0.25 N. Aun así, pueden aparecer falsos positivos debido a la fragilidad de los tejidos. De hecho, el grupo ITI (*International Team for Implantology*) llevó a cabo un metaanálisis en el que se comprobó que únicamente el 24.1% (IC95 % 19.3 % - 29.7 %) de los implantes con sangrado al sondaje tenían periimplantitis (209). Para disminuir estos falsos positivos se ha propuesto utilizar escalas que en lugar de registrar el sangrado con una escala dicotómica, se considere la profusión y el tiempo que pasa desde el sondaje del implante hasta el inicio del sangrado (204).

Respecto a la supuración cabe señalar que este parámetro diagnóstico no se ha explorado en profundidad para monitorizar los implantes dentales (204). La supuración consiste en la salida de un exudado purulento compuesto por tejido necrótico, células muertas, microorganismos y un fluido rico en proteínas que contiene mediadores inflamatorios y residuos bacterianos (204). Por lo tanto, la presencia de supuración en un implante dental implica un proceso inflamatorio activo. Fransson y cols. (210) reportaron que el 19 % de los implantes con periimplantitis supuraban, siendo los implantes con periimplantitis con lesiones moderadas y avanzadas los que presentaban un mayor riesgo de supuración. En este sentido, el exudado espontáneo de pus también se ha asociado a una mayor pérdida ósea periimplantaria y a una profundidad de sondaje aumentada (211).

Una vez se ha hecho la exploración clínica se deben solicitar las pruebas complementarias pertinentes. En la primera visita del paciente, la ortopantomografía se considera una radiografía de primer orden que sirve para explorar los dientes/implantes, los huesos maxilares y las estructuras anexas. Esta técnica radiográfica presenta algunas limitaciones como la superposición de imágenes, la distorsión no lineal y la falta de nitidez y de detalle. Sin embargo, la ortopantomografía se sigue utilizando para evaluar la pérdida ósea marginal alrededor de implantes dentales ya que su uso puede ser especialmente útil en los pacientes edéntulos que presentan atrofia de los huesos maxilares (134,189,212).

La radiografía periapical es la técnica radiográfica más utilizada y recomendada para monitorizar la pérdida ósea alrededor de los implantes dentales. La radiografía periapical también presenta algunas limitaciones como, por ejemplo, que puede haber superposición de estructuras anatómicas, distorsión de la imagen y que sigue siendo una imagen radiográfica en dos dimensiones, por lo que no se puede valorar el hueso vestibular y lingual/palatino del implante. Además, en determinadas ocasiones no son

fáciles de hacer y estandarizar (213–215). García-García y cols. (214) encontraron que las radiografías periapicales infraestimaban el defecto óseo periimplantario (DM = 1.3 mm, IC 95 % 0.3 - 2.2 mm; $p = 0.012$). Dicho de otro modo, los niveles óseos medidos durante la cirugía eran más apicales que los que se observaban en la radiografía periapical.

Con el objetivo de superar las desventajas de la bidimensionalidad, se ha propuesto el uso de la tomografía computadorizada de haz cónico (TCHC) para el estudio preoperatorio de los defectos óseos de la periimplantitis. Se debe considerar que los artefactos metálicos provenientes del implante dental pueden impedir un correcto diagnóstico (215). Insua y cols. (216) estudiaron la precisión diagnóstica de la TCHC para identificar los defectos óseos periimplantarios y encontraron que, aunque esta técnica infraestimaba el defecto óseo, permitía diagnosticar mejor la clase y la morfología del defecto óseo del implante en comparación con las radiografías intraorales.

En conclusión, será el dentista el que decida qué prueba radiográfica utilizar en función de la situación clínica y siempre siguiendo el principio ALARA (As Low As Reasonably Achievable).

La morfología del defecto periimplantario tiene un impacto directo en el abordaje quirúrgico a realizar. La exploración clínica y radiográfica permite en la mayoría de las ocasiones anticipar el tipo de defecto periimplantario. Sin embargo, la clasificación exacta del defecto óseo periimplantario solo se puede llevar a cabo de forma intraquirúrgica (217). Sirva de ejemplo la exploración radiográfica en la Figura 4 y el defecto óseo periimplantario intraoperatorio en la Figura 5 del mismo paciente.

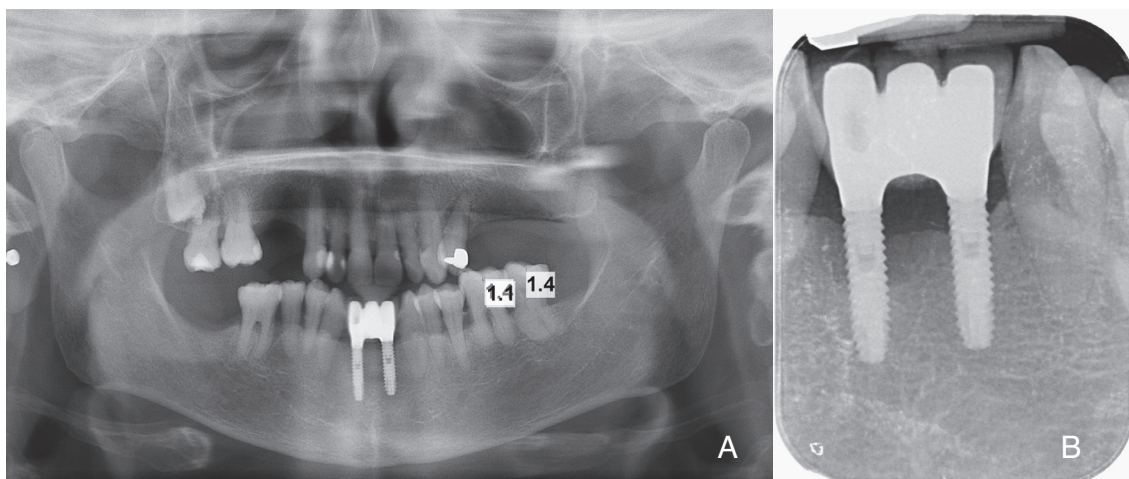


Figura 4. Exploración radiográfica del mismo paciente con implantes dentales: A) ortopantomografía B) radiografía periapical.

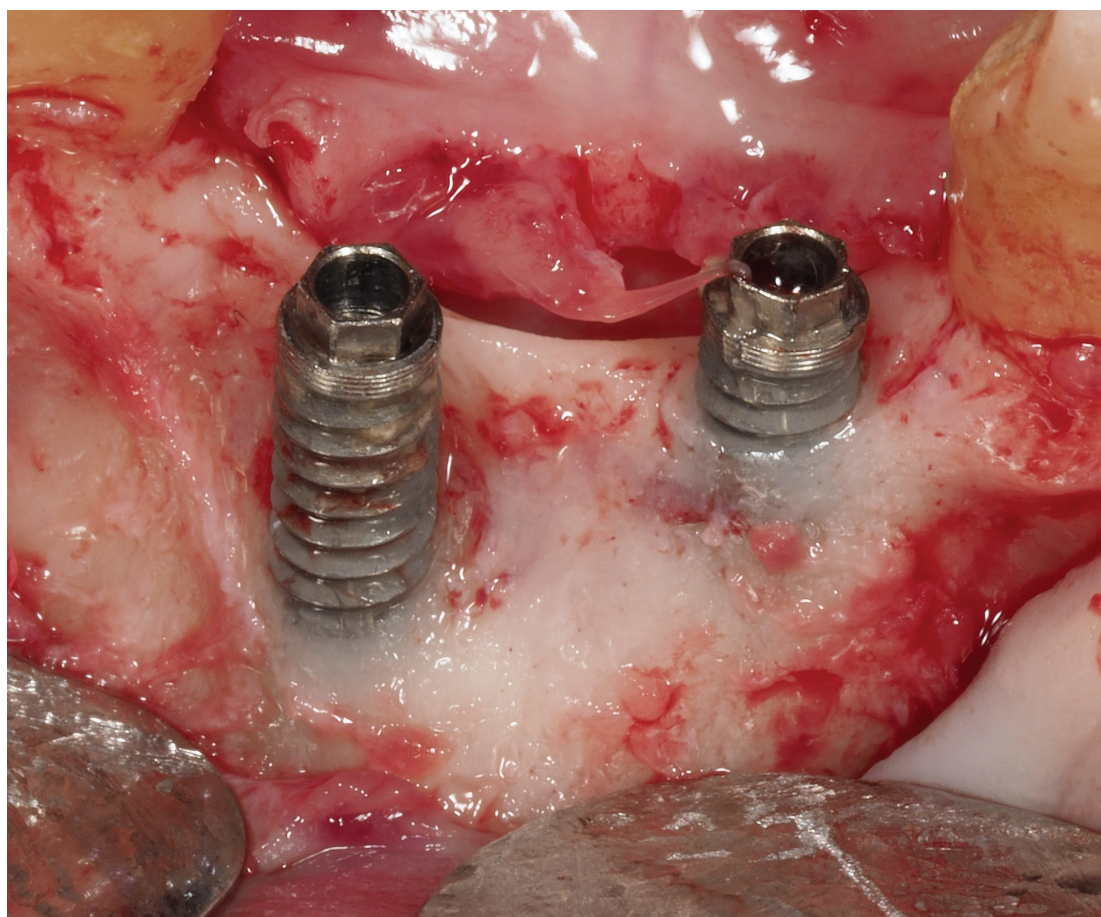


Figura 5. Imagen clínica de dos defectos óseos periimplantarios.

Los primeros autores en clasificar los defectos óseos periimplantarios fueron Schwarz y cols. (217). A grandes rasgos, distinguen los defectos periimplantarios en intraóseos (Clase Ia, Ib, Ic, Id, Ie) y supracrestales (Clase II). Más tarde, Monje y cols. (218) describieron su propia clasificación añadiendo alguna modificación respecto a la anterior (Figura 6):

- Clase 1: Defecto intraóseo.
 - Clase 1A: Dehiscencia vestibular.
 - Clase 1B: Defecto de 2-3 paredes.
 - Clase 1C: Defecto circunferencial.
- Clase 2: Defecto horizontal/supracrestal.
- Clase 3: Defecto combinado.
 - Clase 3A: Dehiscencia vestibular y pérdida ósea horizontal.
 - Clase 3B: Defecto de 2-3 paredes y pérdida ósea horizontal.
 - Clase 3C: Defecto circunferencial y pérdida ósea horizontal.

Además, cada implante se subclasificaba en tres grados de severidad en función de la profundidad del defecto medido desde el cuello del implante y de la ratio de pérdida ósea/longitud total del implante dental:

- Grado incipiente: 3-4mm / < 25 % de la longitud del implante.
- Grado moderado: 4-5mm / \geq 25 % - 50 % de la longitud del implante.
- Grado avanzado: >6mm / > 50 % de la longitud del implante.

Por otro lado, se ha propuesto evaluar el fluido crevicular periimplantario para detectar la presencia de enfermedad (219–221). De acuerdo con los resultados de una revisión sistemática y metaanálisis, la medición de citoquinas proinflamatorias en el líquido crevicular de los implantes es una herramienta útil para distinguir entre salud y enfermedad, pero no tanto para diferenciar entre la mucositis periimplantaria y la

periimplantitis (219). La IL1 β y el TNF α fueron las citoquinas más estudiadas entre los estudios incluidos en la revisión (219). Por otro lado, se debe considerar que estas pruebas tienen un coste económico adicional y requieren de un proceso de validación (222).

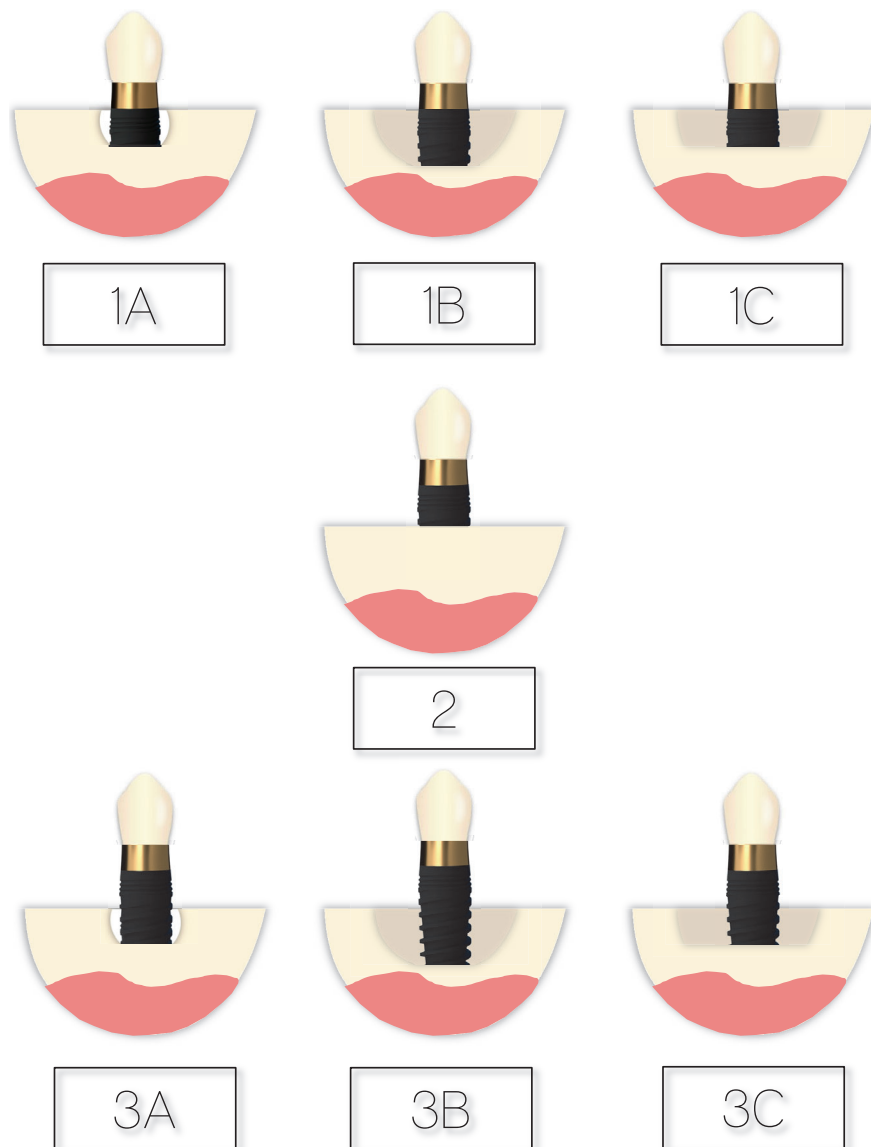


Figura 6. Esquema de la clasificación de los defectos óseos periimplantarios descrita por Monje y cols. (218).

3.5.7. Tratamiento de las enfermedades periimplantarias

El tratamiento de las enfermedades periimplantarias tiene como objetivo detener la pérdida ósea periimplantaria y resolver la inflamación de los tejidos que rodean el implante dental. Para lograrlo, parece que un paso fundamental es descontaminar la superficie del implante durante el tratamiento no quirúrgico o la cirugía periimplantaria (223).

Cuando la superficie de un implante dental se expone a la cavidad bucal, ésta se contamina con un biofilm oral. Este biofilm crece de una forma más rápida y madura en superficies rugosas que en mecanizadas (224). De hecho, numerosos estudios preclínicos han reportado que la rugosidad superficial de los implantes dentales podría influir en el desarrollo de la periimplantitis (225–228). Sin embargo, no existen suficientes datos en humanos que demuestren esta relación causa-efecto (229). Los resultados que comparan la pérdida ósea alrededor de implantes mecanizados o con superficies tratadas son controvertidos. Algunos autores han observado una menor pérdida ósea alrededor de implantes con superficies rugosas en comparación con las mecanizadas (230,231), mientras que otros reportaron lo contrario (232,233).

No hay duda de que, aunque los tratamientos superficiales han mejorado la osteointegración del implante dental, también han dificultado su descontaminación. En la literatura se han descrito distintos métodos para eliminar el biofilm sobre la superficie del implante como, por ejemplo, sistemas mecánicos (p. ej.: curetas, cepillos de titanio, ultrasonidos o aeropulidores) (234), sustancias químicas (p. ej.: antisépticos, suero salino, ácido cítrico, peróxido de hidrógeno) (235), distintos tipos de láser (Er:YAG, CO₂ y láser de diodo) (236), terapia fotodinámica (237), dispositivos electrolíticos (238) o bien, una combinación de ellos (239). Como veremos más adelante, la implantoplastia se considera un método de descontaminación mecánica

que a diferencia de las otras estrategias modifica la superficie expuesta del implante dental (240).

Sigue sin estar claro cuál es el método más eficaz para descontaminar la superficie del implante. La elección dependerá de factores como la eliminación del biofilm, el efecto bactericida, la alteración de la superficie del implante, la biocompatibilidad, el coste económico, la comodidad del paciente, la comodidad del operador, el efecto clínico y el tiempo de uso del método de descontaminación. Es importante considerar que ningún método de descontaminación ha demostrado eliminar completamente el biofilm debido a las características microsuperficiales y al macrodiseño de los implantes dentales (241). Además, independientemente del tratamiento superficial que se haya aplicado, este co-agregado de bacterias volverá a crecer sobre la superficie del implante al cabo de pocos minutos (242). Por lo tanto, el método de descontaminación ideal debe ser aquel que tenga un efecto sostenido en el tiempo e impida la formación de un nuevo biofilm disbiótico. Lamentablemente, no se dispone de un método de descontaminación del implante dental con estas características (242).

Si bien un tratamiento no quirúrgico es suficiente para la remisión de la mucositis periimplantaria (243–245), la periimplantitis requiere de un enfoque quirúrgico adicional debido al macrodiseño y a la microsuperficie del implante dental (246). Recientemente algunos estudios han reportado que el tratamiento no quirúrgico con curetas, aeropulidor y ultrasonidos combinado con la administración sistémica de metronidazol permite mejorar los parámetros clínicos y radiológicos de implantes con defectos óseos periimplantarios (247–250). Sin embargo, aún se requieren ensayos clínicos aleatorizados bien diseñados a largo plazo para poder establecer recomendaciones clínicas más robustas. En resumen, el tratamiento no quirúrgico de la periimplantitis no permite resolver el cuadro clínico de la periimplantitis, pero es necesario para preparar los tejidos para la intervención quirúrgica. De hecho, diversos

trabajos abogan para que la cirugía periimplantaria no se posponga más de las seis primeras semanas tras el tratamiento no quirúrgico (251).

En la actualidad el tratamiento quirúrgico de la periimplantitis puede comprender el curetaje del tejido inflamatorio (cirugía de acceso), la eliminación de la bolsa periimplantaria mediante el desplazamiento apical de los tejidos (cirugía resectiva), la reconstrucción del hueso de soporte perdido (cirugía regenerativa o reconstructiva) o bien, una combinación de estas técnicas (223). En los casos en los que el implante dental se considere irrecuperable, ya sea por la extensión de la lesión periimplantaria o bien por el fracaso de la osteointegración, el único tratamiento posible es la explantación del implante dental y la posterior reevaluación del caso (252) (Figura 7).

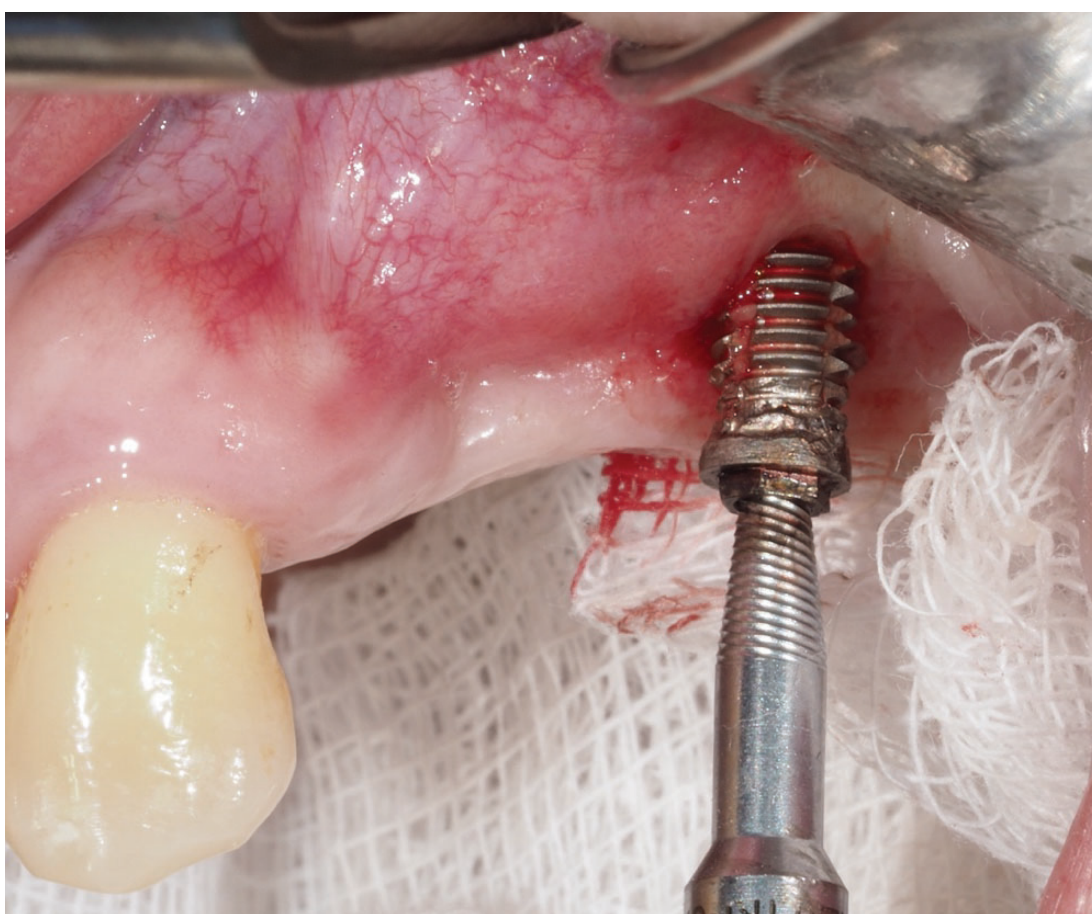


Figura 7. Imagen clínica de la explantación de un implante dental con el *Implant Retrieval*® (Nobel Biocare®, Kloten, Suiza).

La elección del enfoque quirúrgico se basará en la extensión y morfología del defecto óseo periimplantario, así como en la localización del implante dental y su compromiso estético (239,251) (Figura 8).

La cirugía de acceso está indicada en implantes dentales con defectos óseos periimplantarios supracrestales con compromiso estético (239). Esta técnica consiste en levantar un colgajo mucoperióstico a espesor total en vestibular y en palatino/lingual. Posteriormente se elimina el tejido de granulación y se descontamina la superficie del implante dental. Con la cirugía de acceso se intenta preservar al máximo los tejidos óseo y mucoso para prevenir posibles secuelas estéticas (239). Heitz-Mayfield y cols. (253) publicaron una serie de 24 pacientes con 36 implantes dentales con periimplantitis que se trataron mediante cirugía de acceso. Los autores reportaron que únicamente el 43 % de los implantes tuvieron una resolución completa de la enfermedad al cabo de 5 años.

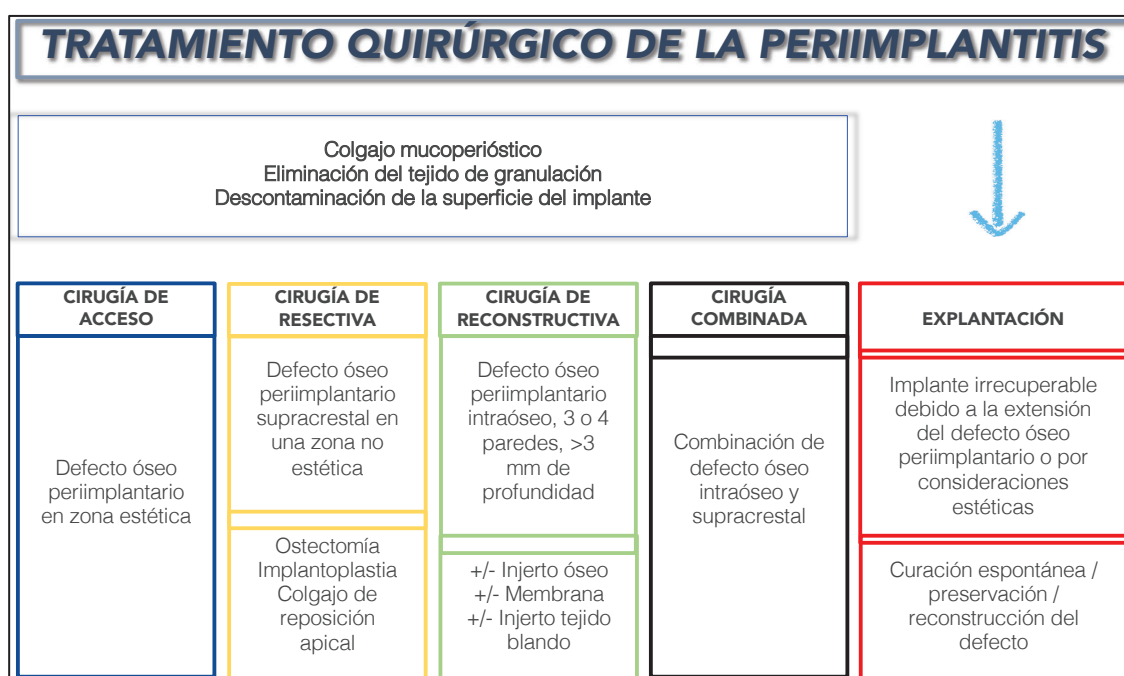


Figura 8. Infografía de los distintos abordajes quirúrgicos de la periimplantitis (239).

La cirugía resectiva se ha propuesto en implantes dentales con defectos óseos periimplantarios con un componente supracrestal predominante y cuando no existe un compromiso estético evidente (p.ej., regiones posteriores o línea de sonrisa baja) (239). Esta técnica tiene como objetivo regularizar la arquitectura ósea y eliminar la bolsa periimplantaria mediante la reposición apical de los tejidos.

El enfoque quirúrgico resectivo también comprende la descontaminación de la superficie del implante dental y la eliminación del tejido de granulación. Es importante destacar que después de la cirugía resectiva periimplantaria la superficie tratada del implante dental puede quedar expuesta a la cavidad bucal (239).



Figura 9. Imagen clínica de dos implantes dentales a los que se les ha efectuado una implantoplastia. La flecha amarilla marca las partículas de Ti en el tejido conectivo, mientras que las flechas blancas señalan las zonas de difícil acceso en las que no se pudo realizar correctamente la implantoplastia.

Diversos autores han reportado que las superficies rugosas retienen más placa bacteriana (254–256) por lo que se ha propuesto la implantoplastia después de la cirugía resectiva periimplantaria para descontaminar la superficie del implante, eliminar sus espiras y disminuir su rugosidad superficial (257,258).

Actualmente no existe un protocolo de fresado estandarizado para hacer la implantoplastia (259,260). Parece que independientemente del tipo de fresas que se utilicen se consigue disminuir la rugosidad superficial del implante dental.

La práctica más extendida es utilizar fresas de diamante o de carburo de tungsteno para eliminar las espiras del implante y posteriormente utilizar fresas de Arkansas o pulidores de carburo de silicio para disminuir la rugosidad superficial del implante dental (257,259,261). Ramel y cols. (259) compararon el efecto de seis protocolos distintos de implantoplastia sobre los valores Ra de la superficie del implante. Estos autores observaron que la menor rugosidad superficial se consiguió con fresas de diamante y de carburo de silicio ($Ra = 0.32 \mu m$). Sin embargo, recomendaron el uso de fresas de diamante de distinto grano (106, 40 y $15 \mu m$) y de Arkansas para evitar la liberación de residuos provenientes de las fresas de carburo de silicio. Entre los distintos estudios que han evaluado la rugosidad superficial tras la implantoplastia, el fresado del implante con carburo de tungsteno y dos pulidores de carburo de silicio parece ser el que ha obtenido una menor rugosidad superficial ($Sa = 0.1 \mu m$) (257).

Todos estos trabajos se llevaron a cabo en el laboratorio bajo condiciones ideales por lo que presentan una escasa validez externa. Son necesarios estudios que simulen un entorno más real. Hasta entonces, no está claro qué valores de rugosidad superficial se pueden conseguir con la implantoplastia en la cavidad bucal donde puede ser difícil pulir toda la circunferencia del implante dental.

Diversos estudios clínicos han reportado que la implantoplastia mejora los parámetros clínicos y radiográficos en comparación con la cirugía resectiva sola (240,262–266). Sin embargo, Ravidà y cols. (267) reportaron que independientemente de si se efectúa o no la modificación de la superficie del implante (implantoplastia), la supervivencia está condicionada a la cantidad de pérdida ósea marginal previa a la cirugía periimplantaria. De este modo, el análisis multinivel mostró que el riesgo de fracaso del

implante dental fue 18.6 veces mayor (IC 95 % 1.23 a 280.5, $p = 0.035$) cuando la pérdida ósea marginal inicial fue superior al 50 % de su superficie.

Es importante mencionar que, tal y como se puede ver en las Figuras 9 y 10, durante el fresado del implante dental se liberan diversas partículas metálicas al entorno periimplantario que se incrustan en los tejidos blandos y en el hueso (268–270). La presente tesis doctoral se compone de diversas investigaciones que tienen como objetivo analizar las características fisicoquímicas de las partículas de Ti liberadas durante la implantoplastia, así como su efecto biológico en el entorno periimplantario.

La cirugía reconstructiva de la periimplantitis es aquella que tiene como objetivo eliminar la bolsa periimplantaria mediante la reconstrucción del defecto intraóseo (271,272). Inicialmente se pretendía conseguir la re-osteointegración del implante; sin embargo, este término implica un concepto histológico que no puede demostrarse en el ambiente clínico (273). Hoy en día se prefiere usar el término de cirugía periimplantaria reconstructiva en lugar de cirugía regenerativa, porque lo que se busca es rellenar el defecto óseo sin importar si se produce una re-osteointegración.

El procedimiento quirúrgico consiste en levantar un colgajo mucoperióstico a espesor total por vestibular y por lingual/palatino y eliminar el tejido de granulación (Figura 11). A continuación, se limpia la superficie del implante mediante alguno de los métodos de descontaminación descritos anteriormente. Una vez se han aplicado las técnicas de descontaminación periimplantarias, generalmente se procede a rellenar el defecto óseo con un injerto particulado y a cubrir el sustituto óseo con una membrana de colágeno. Finalmente se sutura la herida sin la prótesis (abordaje sumergido) o con ella (Figura 12).

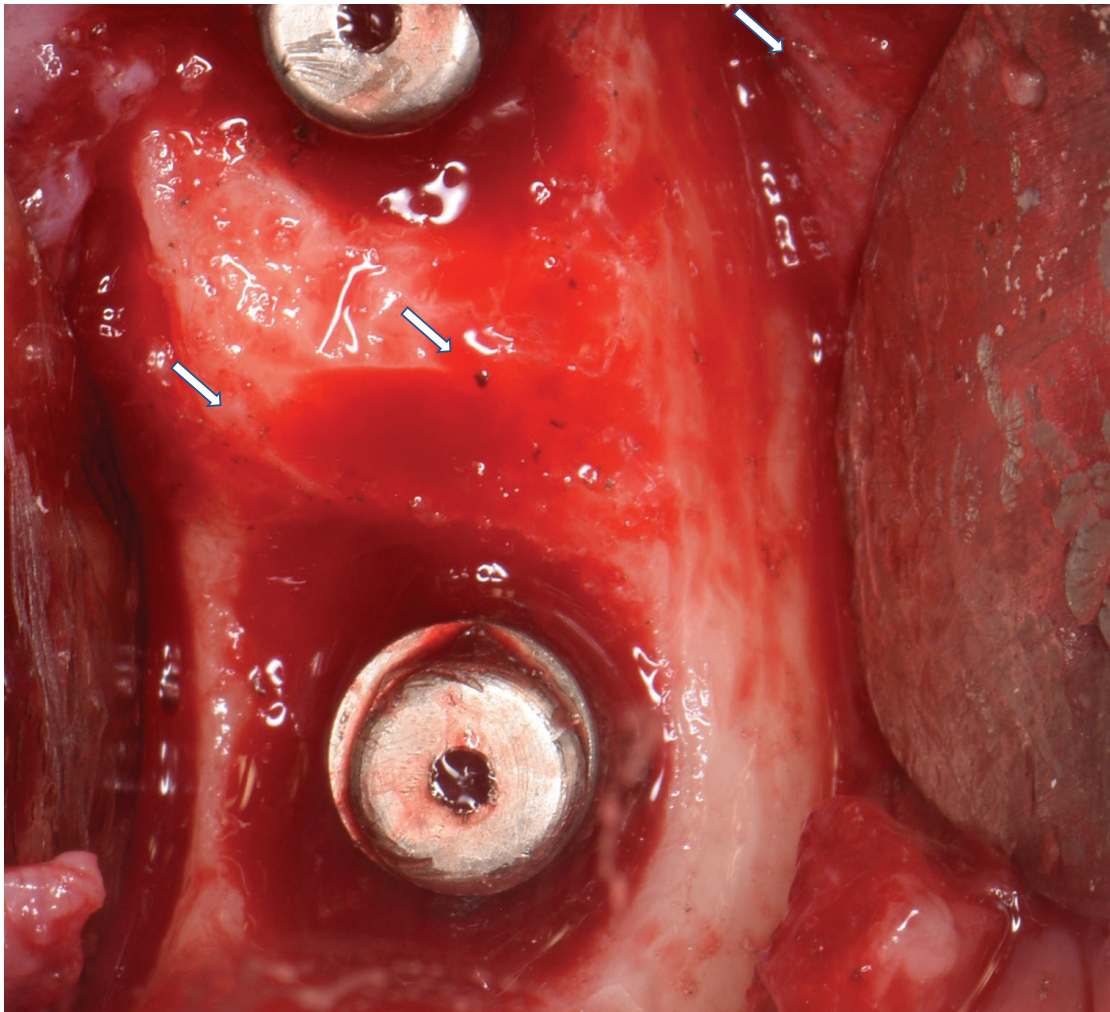


Figura 10. Imagen clínica en la que se muestra como se insertan partículas metálicas de distinto tamaño en el hueso y en el tejido blando periimplantario después de la implantoplastia.

Es importante destacar que existen distintos aspectos quirúrgicos de la cirugía reconstructiva periimplantaria que aún están sujetos a debate y a estudio (274). En primer lugar, no conocemos qué injerto óseo es el más adecuado para la reconstrucción de los defectos periimplantarios. Hasta el momento el xenoinjerto (275) es el material más utilizado y con mayor respaldo bibliográfico. Sin embargo, también se ha utilizado el hueso autólogo (276), los aloinjertos (277) o los materiales aloplásticos (278). Estos sustitutos óseos se pueden aplicar solos o en combinación con otros. En segundo lugar, también se ha cuestionado la necesidad de rellenar el defecto periimplantario con un sustituto óseo (274,279). Derks y cols. (279) han publicado un reciente ensayo clínico aleatorizado multicéntrico en el que se comparó

rellenar o no el defecto periimplantario con un sustituto óseo particulado. Los resultados sugieren que no hay diferencias entre los grupos en términos de profundidad o sangrado al sondaje, aunque parece que en el grupo que se utilizó el material de relleno la recesión fue significativamente menor (DM = 0.40 mm, IC 95 % 0.06 a 0.73 mm; $p = 0.02$). También existe cierto debate acerca del uso o no uso de una membrana barrera para cubrir el material de injerto, aunque la mayoría de los autores prefieren utilizarla. Finalmente, los datos son controvertidos cuando se evalúa el cierre de los colgajos después de una cirugía periimplantaria. Si bien un abordaje sumergido parece seguir los principios básicos de una regeneración ósea predecible, no existen ensayos clínicos que confirmen su superioridad frente a dejar que los tejidos cicatricen con la prótesis atornillada (abordaje transmucoso) (280–283).

Respecto a los estudios publicados sobre la cirugía reconstructiva, vuelve a sorprender que, en general, los resultados son bastante pobres. Parece que a corto plazo (12 meses) los parámetros clínicos y radiológicos mejoran después de la reconstrucción de los defectos óseos periimplantarios intraóseos (282,284); sin embargo a mayor tiempo de seguimiento esta terapia parece ser impredecible (284). La Monaca y cols. (284) encontraron que el porcentaje de éxito después de la cirugía reconstructiva periimplantaria fue del 91 % el primer año y disminuyó hasta el 59 % en el quinto año de seguimiento. Solo hubo mejoría en el sangrado al sondaje, pero ni la profundidad al sondaje ni la pérdida ósea radiográfica mejoraron respecto a la situación clínica basal. En un estudio más reciente de Roccuzzo y cols. (285) reportaron que el tratamiento periimplantario fue exitoso en el 45.3 % de los casos, mientras que se extrajeron 13 implantes (20.3 %) por infecciones de repetición. Los autores señalaron que la mayoría de los pacientes con problemas periimplantarios no cumplían con las visitas del programa de mantenimiento periimplantario. De hecho, demostraron que hubo una correlación estadísticamente significativa entre la adhesión

del paciente a la terapia de mantenimiento periimplantario y el porcentaje de supervivencia del implante a los 5 años de seguimiento (OR 0.17; IC 95 % 0.05-0.64; $p = 0.009$).

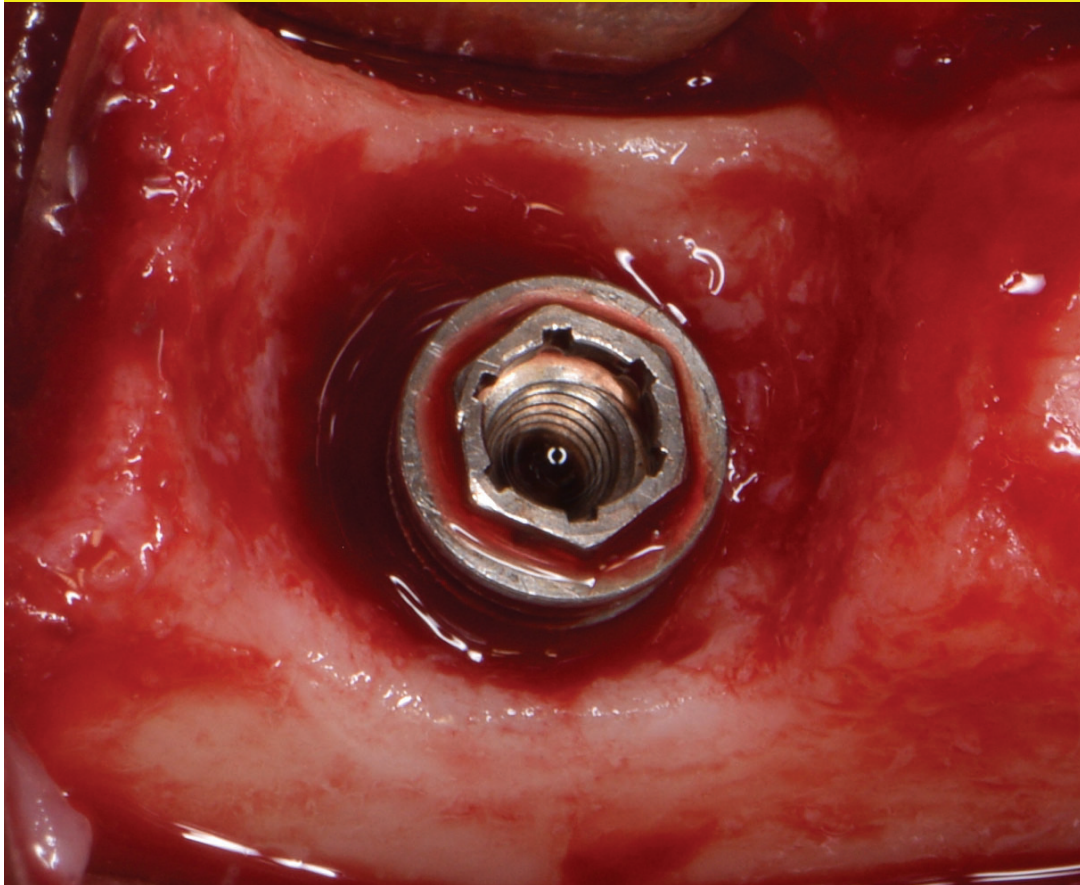


Figura 11. Abordaje quirúrgico reconstructivo. Puede observarse que el defecto periimplantario tiene un predominante componente intraóseo.

Finalmente, como se ha dicho anteriormente, dependiendo de la morfología del defecto óseo puede ser necesaria una combinación de estas técnicas. Según Monje y Schwarz (251) la cirugía combinada está indicada en los siguientes escenarios clínicos:

- Defecto óseo periimplantario parcialmente contenido (dos/tres paredes) con una zona fuera del "potencial reconstructivo" debido a una posición inadecuada del implante (a menudo hacia vestibular).

- Defecto óseo periimplantario parcialmente contenido (dos o tres paredes) con una zona que presenta un componente supracrestal y el implante dentro del alojamiento óseo.
- Defecto óseo periimplantario parcialmente contenido (dos/tres paredes) con un área que presenta una morfología no contenida (es decir, componente supracrestal) y con el implante fuera del alojamiento óseo (a menudo hacia vestibular).
- Defecto óseo periimplantario contenido de cuatro paredes con un área que presenta un componente supracrestal.



Figura 12. Abordaje transgingival después de una cirugía periimplantaria.

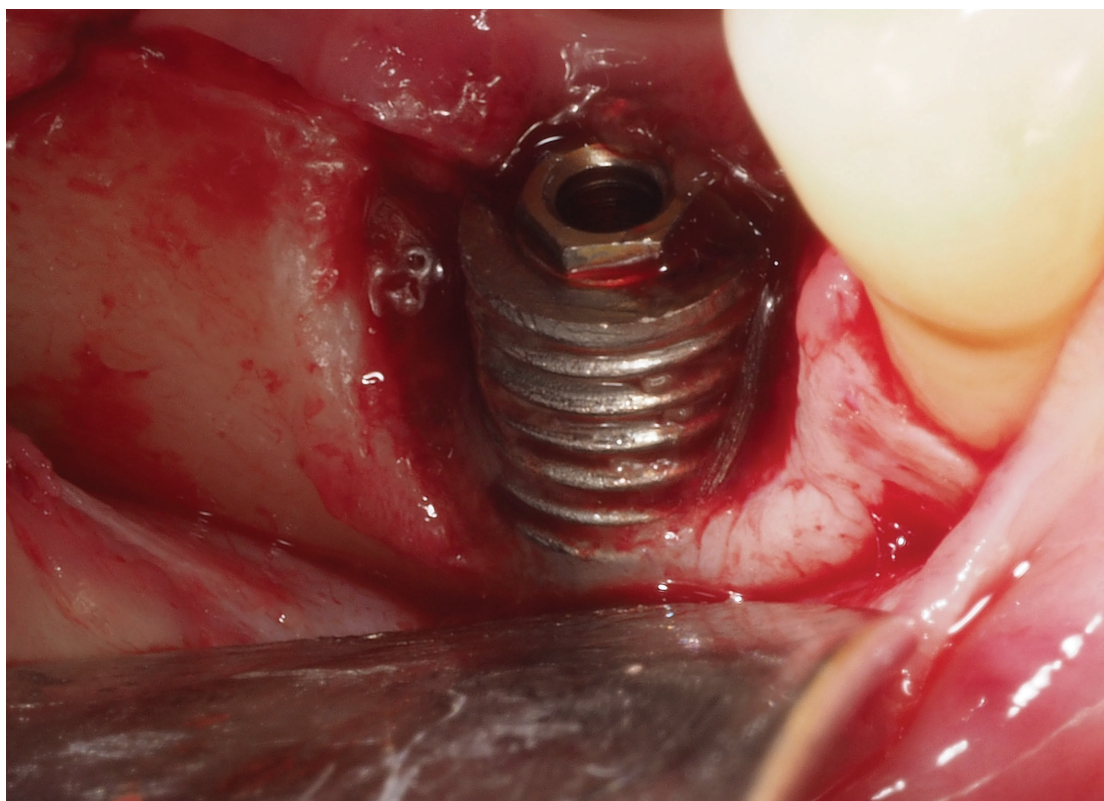


Figura 13. Cirugía periimplantaria combinada. Evaluación del defecto óseo después del legrado del tejido inflamatorio.

La cirugía combinada consiste en elevar un colgajo mucoperióstico vestibular y lingual/palatino a espesor total. En casos concretos puede ser necesario el acondicionamiento de los tejidos blandos mediante un injerto de tejido conectivo para evitar la retracción de la mucosa en la zona estética (286), o bien, un injerto gingival libre para aumentar la mucosa queratinizada alrededor del implante (287).

Después del levantamiento de los colgajos se procede a eliminar el tejido de granulación y se analiza el potencial reconstructivo del defecto óseo (Figura 13). Se sugiere la implantoplastia en las paredes del implante que no tienen potencial reconstructivo y que se expondrán a la cavidad bucal. Cabe señalar que Monje y Schwarz (251) recomiendan llevar a cabo la implantoplastia antes de hacer la exéresis del tejido de granulación para eliminarlo posteriormente junto a las partículas de Ti liberadas durante la implantoplastia. Posteriormente, se sigue la secuencia quirúrgica comentada en el apartado de la cirugía reconstructiva; descontaminar la porción

intraósea del implante, rellenar el defecto periimplantario con injerto óseo particulado, cubrir con una membrana reabsorbible y el cierre de los tejidos (Figura 14). Con este enfoque combinado se consiguen buenos resultados a corto plazo (288), pero siguen faltando datos con un mayor tiempo de seguimiento.

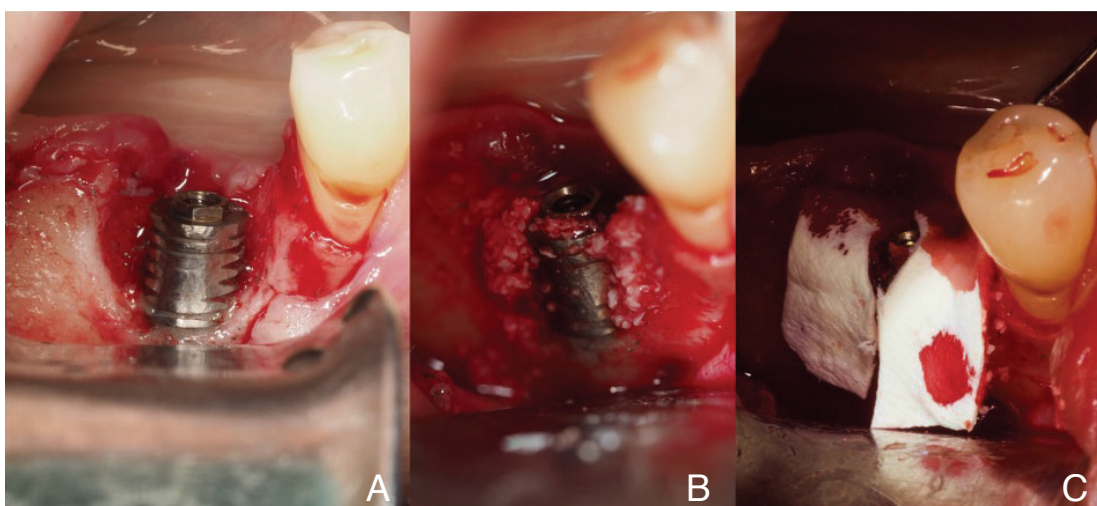


Figura 14. Secuencia quirúrgica de la cirugía combinada: A) desbridamiento del tejido de granulación e implantoplastia de la dehiscencia vestibular, B) relleno del defecto con un sustituto óseo de origen bovino, C) membrana de colágeno para cubrir el material óseo particulado.

Existen pocos artículos en la literatura que hayan evaluado el pronóstico del tratamiento quirúrgico de las enfermedades periimplantarias (289–291). A pesar de los esfuerzos de mejorar los resultados de la cirugía periimplantaria, los datos distan de ser óptimos. La recurrencia de la enfermedad parece ser del 44 % en un intervalo de seguimiento entre 1 y 5 años (292). Un reciente estudio retrospectivo analizó los factores asociados con la pérdida del implante y los resultados favorables después de la cirugía periimplantaria (291). La localización anterior del implante (OR = 0.22; IC 95 % 0.06 – 0.77; $p = 0.017$) y el porcentaje de pérdida ósea antes del tratamiento quirúrgico (OR = 20.2; IC 95 % 2.42 – 169.6; $p = 0.014$) fueron los factores asociados con la pérdida del implante dental y la progresión de la enfermedad. Por otro lado, los pacientes que acudían como mínimo 3 veces al año a visitas de mantenimiento

presentaban mejores resultados (OR = 0.14; IC95 % 0.02 – 0.93; p = 0.042) después de la cirugía reconstructiva (291).

Actualmente disponemos de pocos datos acerca del efecto de estas terapias periimplantarias a largo plazo. Además, la mayoría de los estudios presentan una muestra pequeña y un alto riesgo de sesgo (293–295). Por otro lado, la mayoría de los trabajos publicados reportan un éxito a medio plazo cercano al 50 %, por lo que se pone de manifiesto la necesidad de establecer estrategias de prevención para evitar el desarrollo de las enfermedades periimplantarias. Se requieren campañas de difusión para promocionar las visitas de mantenimiento y para poder implementar programas de prevención (296,297). Si estas estrategias fracasan, la resolución de la enfermedad es muy difícil con la terapéutica actual.

Todos los pacientes con implantes dentales deben incorporarse a un programa de mantenimiento. La periodicidad de las visitas se fijará en función de los factores e indicadores de riesgo que presenta el paciente. Monje y cols. (298) publicaron una revisión sistemática y metaanálisis en la que concluyeron que los pacientes con implantes dentales debían acudir a visitas de mantenimiento cada 5 o 6 meses. De este modo, es más factible prevenir la aparición de las enfermedades periimplantarias y, en caso de que se desarrollen, llevar a cabo su tratamiento precoz.

3.6. Justificación

Los implantes dentales permiten restituir tanto la función como la estética de las personas que han perdido dientes o carecen de ellos (31,57,233,299,300). Estos dispositivos endoóseos se basan en el fenómeno de osteointegración y se fabrican con Ti c.p. o bien con aleaciones de Ti, como el Ti6Al4V o el Ti-Zr. Las principales ventajas del Ti son su biocompatibilidad y su elevada resistencia a la corrosión.

Actualmente el proceso de fabricación de los implantes dentales incluye distintos tratamientos superficiales para aumentar su rugosidad. De este modo se incrementa la superficie de contacto con el hueso y se favorece la osteointegración (84,189).

La concurrencia de pérdida ósea progresiva alrededor de un implante dental osteointegrado e inflamación de la mucosa alrededor del mismo se ha denominado periimplantitis (136). Esta patología es altamente prevalente en nuestra sociedad, así como en el resto del mundo (183), y por lo tanto tiene un enorme impacto sobre la comunidad científica odontológica (176). Actualmente la opinión más extendida es que la periimplantitis tiene una etiología bacteriana; sin embargo, se ha sugerido que las partículas metálicas de Ti pueden desarrollar o agravar cambios inflamatorios en la mucosa periimplantaria asociados a pérdida ósea marginal progresiva (136).

Para el abordaje de la periimplantitis se han aplicado los principios del tratamiento periodontal, que se basan fundamentalmente en la limpieza y la descontaminación de la superficie de los dientes/implantes afectados (136,239). No obstante, existen muchas diferencias entre dientes naturales e implantes dentales, razón por la cual se ha visto que el abordaje terapéutico de la periimplantitis no siempre obtiene los mismos resultados.

Después de la cirugía resectiva o combinada periimplantaria la superficie tratada del implante dental puede quedar expuesta a la cavidad bucal. Con el objetivo de descontaminar esta superficie y dificultar la adhesión bacteriana, se ha empleado la implantoplastia, que consiste en pulir la superficie del componente supracrestal del implante (239). Sin embargo, se han descrito numerosos inconvenientes asociados a esta técnica (268). Aunque algunos de estos inconvenientes ya se han estudiado (257,301–303), hoy en día se necesitan datos para determinar el efecto de estas

partículas metálicas de Ti o de Ti en aleación que se generan durante la implantoplastia.

Por otro lado, se ha comprobado que los macrófagos en contacto con las partículas de Ti desprendidas tras el desgaste mecánico de las prótesis articulares expresan niveles aumentados de citoquinas proinflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, IL6) (304). Dichas citoquinas pueden inhibir la osteogénesis e inducir la reabsorción ósea a través de la vía de RANK-RANKL (305). En el campo de la implantología bucal recientes trabajos han demostrado que las partículas de Ti liberadas de la superficie de los implantes tras el fenómeno de tribocorrosión pueden inducir a reacciones celulares de hipersensibilidad o inflamatorias (306). Los elementos metálicos del implante dental pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la pérdida ósea marginal o de la inflamación de los tejidos periimplantarios (43). De hecho, se ha observado en modelos in vitro que el Ti puede dañar el DNA de las células epiteliales mediante la activación de los marcadores celulares BRCA1 y CHK2 (307). Por todo ello, resulta necesario evaluar el efecto biológico que producen los residuos metálicos liberados durante la implantoplastia.

La periimplantitis ha tenido un crecimiento exponencial en los últimos años. Por esta razón es crucial conocer las repercusiones de la implantoplastia, ya que es la técnica de descontaminación más utilizada en las cirugías resectivas o combinadas. Además, diversos autores han enfatizado la necesidad de estudios que evalúen el efecto local y sistémico de estas partículas metálicas liberadas en el entorno periimplantario (307,308).

4. Hipótesis

- **Principal:** Las partículas de Ti en aleación liberadas durante la implantoplastia no son seguras en el entorno periimplantario.

- **Específica₁:** La implantoplastia altera las características fisicoquímicas del Ti y genera partículas metálicas que son citotóxicas para los fibroblastos y los osteoblastos.

- **Específica₂:** La implantoplastia modifica las propiedades mecánicas del Ti y reduce la resistencia a la corrosión de las partículas de Ti liberadas durante este procedimiento.

- **Específica₃:** Los residuos metálicos liberados durante la implantoplastia inducen la expresión de marcadores pro-inflamatorios e inhiben los marcadores relacionados con la osteogénesis.

- **Específica₄:** Las partículas metálicas de Ti en aleación insertadas en un defecto mandibular en rata provocan una reacción inflamatoria a cuerpo extraño.

- **Específica₅:** Las partículas metálicas de Ti en aleación insertadas en un defecto mandibular en rata elevan la concentración de iones y nanopartículas metálicas en la sangre, el bazo, los pulmones, el hígado y el cerebro.

5. Objetivos

- **General:** Analizar la bioseguridad de las partículas de Ti en aleación liberadas durante la implantoplastia.

- **Específico₁:** Evaluar las propiedades fisicoquímicas y la citotoxicidad sobre fibroblastos y osteoblastos de las partículas metálicas de Ti en aleación liberadas durante la implantoplastia.

- **Específico₂:** Determinar las propiedades mecánicas y la resistencia a la corrosión de las partículas metálicas liberadas durante la implantoplastia.

- **Específico₃:** Analizar la respuesta inflamatoria y osteogénica inducida por las partículas metálicas liberadas durante la implantoplastia.

- **Específico₄:** Evaluar la reacción local de los tejidos circundantes al defecto mandibular provocada por los residuos metálicos de la implantoplastia.

- Específico₅:** Determinar la concentración de iones y nanopartículas metálicas en la sangre, el bazo, los pulmones, el hígado y el cerebro después de insertar los residuos metálicos de la implantoplastia en un defecto mandibular en rata.

6. Material y Método. Resultados

Estudio 1:

Caracterización fisicoquímica y biológica de las partículas de Ti6Al4V obtenidas por implantoplastia: Un estudio in vitro.

Parte I.

- **Autores:** Toledano-Serrabona J, Gil FJ, Camps-Font O, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ.
 - **Título:** Physicochemical and biological characterization of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: An in vitro study. Part I.
 - **Revista:** Materials (Basel).
 - **Edición especial:** Synthesis and applications of novel dental implant materials
 - **Factor de impacto (2021):** 3.748
 - **Posición JCR (Metallurgy & Metallurgical Engineering):** 18/79 (Primer cuartil).
 - **Referencia completa:** Toledano-Serrabona J, Gil FJ, Camps-Font O, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ. Physicochemical and biological characterization of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: An in vitro study. Part I. Materials (Basel). 2021;14:6507.
 - **DOI:** 10.3390/ma14216507.
-

Objetivo

Evaluar las propiedades fisicoquímicas y la citotoxicidad sobre fibroblastos y osteoblastos de las partículas metálicas de Ti en aleación liberadas durante la implantoplastia.

Material y Método

Recogida y preparación de la muestra

Se llevó a cabo la implantoplastia de 60 implantes dentales de Ti6Al4V (Avinent Implant System S.L., Santpedor, España) por el mismo investigador (J.T-S.) siguiendo el protocolo de fresado descrito en el estudio publicado por Costa-Berenguer y cols. (257). Utilizando una turbina GENTLEsilence LUX 8000B (KaVo Dental GmbH, Biberach an der Riß, Alemania) bajo irrigación constante, se modificó secuencialmente la superficie con una fresa de carburo de tungsteno de grano fino (referencia H379.314. 014 KOMET; GmbH & Co. KG, Lemgo, Alemania), un pulidor de carburo de silicio de grano grueso (referencia 9608.314.030 KOMET; GmbH & Co. KG, Lemgo, Alemania) y un pulidor de carburo de silicio de grano fino (referencia 9618.314.030 KOMET; GmbH & Co. KG, Lemgo, Alemania). La muestra se liofilizó para eliminar el agua de los restos metálicos liberados durante la implantoplastia. Una vez obtenidos 10 g de los residuos metálicos de Ti6Al4V se llevó a cabo los estudios de caracterización fisicoquímica y de citotoxicidad celular. El Ti6Al4V estudiado tenía un porcentaje atómico: 5.9 % Al, 3.9 % V, Fe < 0.03 %, C < 0.01 %, O < 0.01 %, y el resto de Ti. El análisis de la composición química se hizo mediante espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS).

Superficie específica

El estudio de la superficie específica se llevó a cabo mediante el equipo ASAP 2020 (Micromeritics, Norcross, GA, EE.UU.) (Figura 15). Se utilizó nitrógeno como

adsorbato. Las partículas metálicas se desgasificaron a 100 °C en condiciones de vacío (10 μ Hg). Se analizó la superficie específica mediante la aplicación de los cálculos matemáticos descritos por la teoría BET (Brunauer–Emmett–Teller) (309). El análisis de la superficie específica se hizo por triplicado.



Figura 15. Equipo de análisis de la superficie específica.

Granulometría

El análisis de la granulometría de la muestra se practicó mediante la utilización de un equipo Mastersizer 3000 (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido) (Figura 16). Este equipo utiliza la técnica de difracción por láser para medir el tamaño de las partículas mediante la cuantificación de la intensidad de luz dispersada a medida que un rayo

láser pasa por la muestra de partículas. Este ensayo se llevó a cabo en medio húmedo, utilizando etanol como medio líquido de dispersión con la cantidad necesaria de polvo para que la obscuración de dispersante y la muestra estuvieran dentro del rango óptimo comprendido entre el 5 % y el 10 %, que finalmente se ajustó al 7 %. El rango de tamaño de las partículas que se puede analizar con este equipo se encuentra entre 10 nm y 3.5 mm. Para evitar la posible aglomeración de las partículas de polvo durante el ensayo de granulometría se utilizaron métodos de agitación mecánicos y de ultrasonidos (2500 r.p.m. y 50 % de sonicación, respectivamente). Para poder llevar a cabo el ensayo se debe escoger el índice de refracción del Ti a analizar. Se hizo un ensayo de DRX para conocer este dato. El valor que se escogió fue el de la fase anatasa, con un índice de refracción de 2.51.



Figura 16. Equipo de análisis de la granulometría.

Microscopía electrónica de barrido

La morfología de las partículas de polvo se evaluó mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 17). Se utilizó un microscopio Phenom XL Desktop SEM, (PhenomWorld, Eindhoven, Holanda) con un voltaje de aceleración de

20 keV. Para observar las partículas metálicas, se colocó la muestra sobre una cinta de carbono adhesiva conductora.

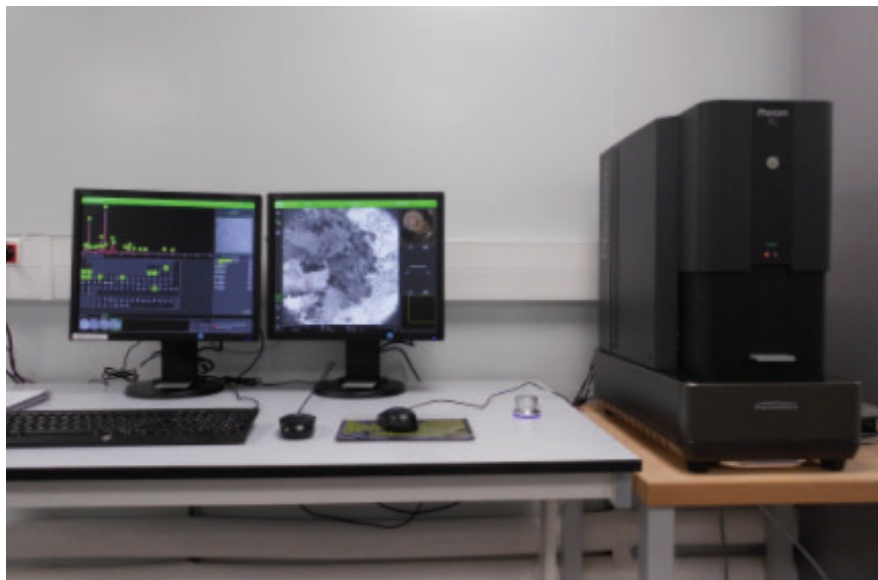


Figura 17. Microscopio electrónico de barrido.

Liberación de iones

La liberación de iones metálicos al medio se evaluó según la norma ISO 10993-12-2009 (310). Se utilizó una proporción de medio/polvo a razón de 1 mL por cada 0.2 g de muestra. Se prepararon tres muestras (N=3) para el análisis (10 mL de medio y 2 g de partículas metálicas por muestra). El medio líquido utilizado para la liberación de iones fue la solución salina de Hank (Sigma-Aldrich, Co Life Science, St. Louis, EE.UU.), que, al estar certificada y comercialmente disponible, garantiza la homogeneidad en la composición del medio. El líquido en contacto con las partículas metálicas se recuperó y se filtró a través de un filtro de tamaño de poro de 0.22 μm . Para el análisis, se acidificó con ácido nítrico al 2 % (HNO_3 69.99 %, Suprapur, Merck, Darmstadt, Alemania) con el objetivo de evitar la precipitación de los iones metálicos antes de medir de su concentración por espectrometría de masas de emisión de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (Figura 18).

Se definieron 5 tiempos de extracción: 1 día, 3 días, 7 días, 14 días y 21 días, tal y como se ha efectuado en estudios similares (311). Las muestras se almacenaron a 37 °C en un horno incubadora y se agitaron a 250 r.p.m., con un ángulo de inclinación de 30°, con el fin de evitar la sedimentación de los restos metálicos durante el ensayo y asegurar la exposición continua de todas las partículas de la muestra con el medio. Las muestras se analizaron mediante ICP-MS (Perkin Elmer Elan 6000, Perkin Elmer Inc., Waltham, EE.UU.). Esta técnica permite el análisis cuantitativo multielemental con una precisión de 1 ppt para el 90 % de los elementos de la tabla periódica.

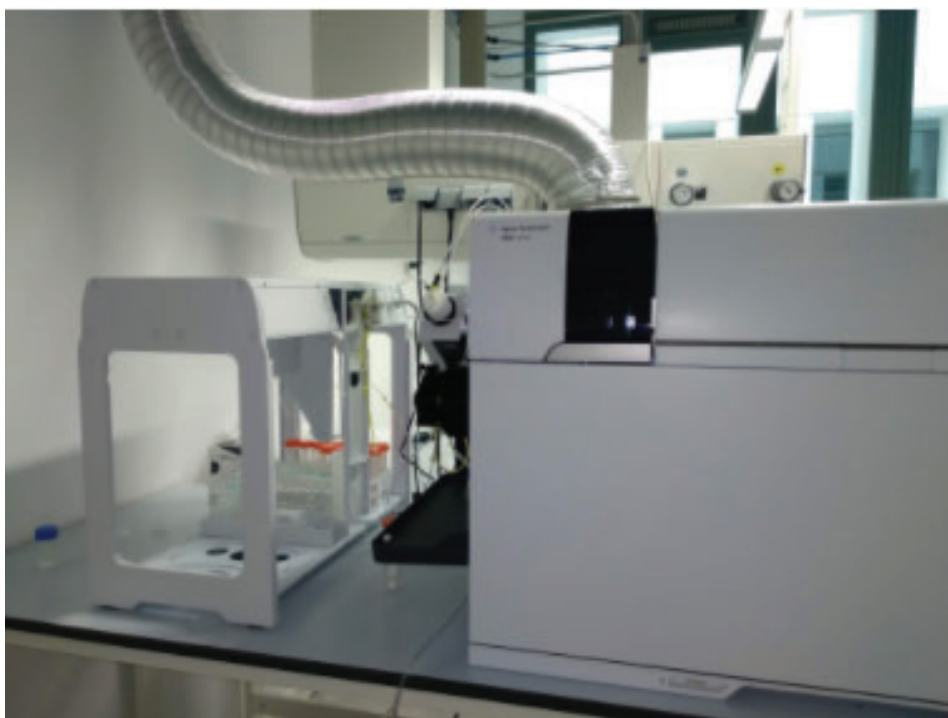


Figura 18. Equipo de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Difracción de rayos X

El análisis de difracción por rayos X se llevó a cabo con un difractómetro (DRX; D8 Advance; Bruker, Karlsruhe, Alemania), equipado con un cristal de germanio y un ánodo Cu K α . Se utilizó a 40 kV y 40 mA (Figura 19).

Se utilizó un total de 1 cm^3 de partículas metálicas para hacer el análisis de difracción de rayos X. Los datos se obtuvieron entre 10° y 60° con un “step size” de 0.02° y tiempo de 1 segundo por paso. La determinación e identificación de las fases se hizo mediante la utilización del software DIFFRAC.EVA (Bruker, Karlsruhe, Alemania). La difracción de rayos X permite determinar las estructuras cristalinas, así como la fase de los materiales cristalinos multifásicos.



Figura 19. Equipo de difracción de rayos X.

Tensiometría

Debido a las características de la muestra, se exploró la posibilidad de analizar el ángulo de contacto mediante mediciones de sorción de líquidos utilizando una balanza Wilhelmy. En condiciones normales, con muestras que presentan una fuerza capilar comparable entre sí (una cierta homogeneidad en el material pulverizado), esta técnica permite calcular el ángulo de contacto mediante el método de Washburn (312).

Según este método, el líquido se extrae por capilaridad. El aumento de masa del tubo, que está suspendido de un sensor de fuerza, se determina con respecto al tiempo durante la medición. Si se considera que los residuos metálicos a granel constituyen un haz capilar, entonces el proceso puede describirse mediante la siguiente ecuación de Washburn:

$$\frac{m^2}{t} = \frac{c \cdot \rho^2 \cdot \sigma \cdot \cos \theta}{\eta}$$

m = masa; t = tiempo de sorción; σ = tensión superficial del líquido; c = constante capilar de la muestra; ρ = densidad del líquido; θ = ángulo de contacto; η = viscosidad del líquido

La constante c incluye el número de microcapilares y su radio medio, y depende de la naturaleza de la muestra y también de la del tubo de medición.

Las mediciones de sorción de las partículas metálicas de Ti se llevaron a cabo con un tensiómetro Krüss Processor K100 (Krüss Scientific Instruments, Matthews, EE.UU.) utilizando un accesorio específico para las pruebas de sorción. Se utilizó agua Milli-Q como líquido humectante.

Citotoxicidad

La citotoxicidad de la muestra se evaluó mediante la determinación por exposición indirecta según la norma ISO 10993 (313).

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo por triplicado (N=3), siendo las muestras estudiadas: muestra de ensayo (restos metálicos de Ti6Al4V), control positivo (células sembradas directamente en la placa) y control negativo: medio sin células.

Las muestras se manipularon de forma aséptica durante todo el ensayo (Figura 20). El ensayo de citotoxicidad consiste en evaluar el porcentaje de supervivencia celular de una línea celular conocida cuando se expone al medio que ha estado en contacto con

un determinado material. En este caso, se hizo una prueba de citotoxicidad por contacto indirecto según las directrices especificadas en la norma ISO 10993-5 "Evaluación biológica de productos sanitarios", parte 5 "Pruebas de citotoxicidad in vitro". Para cuantificar la citotoxicidad, se calculó el porcentaje de supervivencia celular, que indica citotoxicidad si éste es menor al 70 %.



Figura 20. Cabinas de cultivo celular.

Dado que estas partículas metálicas están en contacto tanto con el hueso como con los tejidos blandos, se utilizaron dos líneas celulares humanas: SAOS-2 (ATCC® HTB-85) y HFF-1 (ATCC® SCRC-1041). Las células se almacenaron con dimetilsulfóxido como criopreservante a -180 °C, y se ensayaron bimensualmente para verificar la ausencia de micoplasma.

Las células se cultivaron en un incubador con control de humedad y suministro de CO₂ al 5 %. Siguiendo la recomendación del fabricante, se utilizó el medio McCoy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) para el cultivo de SAOS-2 y el medio Eagle

modificado de Dulbecco (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) para el cultivo de HFF-1, suplementado con un 10 % de Suero Bovino Fetal (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.), 1 % de L-glutamina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) y 1 % de penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). El medio se almacenó a 4 °C y los suplementos a -20 °C. Los extractos se analizaron siguiendo el apartado 8.2 de la norma ISO 10993-5.

Para ello, se incubó el material (partículas metálicas) en medio suplementado a una ratio de 1 mL por 0.2 g de muestra, durante 72 horas a 37 °C. Las células se sembraron a una densidad de $2 \cdot 10^4$ células/mL 24 horas antes de ponerlas en contacto con los extractos de las muestras.

Las células se incubaron 24h con el extracto sin diluir y diluido 1/2, 1/10, 1/100 y 1/1000, utilizando medio completo para las diluciones. Se observaron las células para verificar la adhesión y morfología antes y después de ponerlas en contacto con los extractos. Una vez finalizado el ensayo, las células se lisaron con el reactivo mPER, y se analizó la viabilidad celular a partir de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH, Roche Applied Science, Penzberg, Alemania). El cálculo de la viabilidad celular se llevó a cabo según las recomendaciones del fabricante, midiendo la absorbancia a 492 nm.

Análisis estadístico

La superficie específica se hizo por triplicado. Los datos se registraron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel (Microsoft®, Redmond, Washington, EE.UU.) y se procesaron posteriormente con el software Stata 14 (StataCorp®, College Station, EE.UU.). Se calcularon las medias y las desviaciones típicas, excepto para la prueba de granulometría, en la que se utilizaron la moda y los percentiles.

Resultados

Superficie específica

Las partículas metálicas presentaron valores de superficie específica que oscilaron entre 0.2 y 0.4 m²/g (Tabla 7). Este rango es debido a la dispersión de los tamaños de las partículas de Ti de la muestra, tal y como puede observarse en los resultados de la granulometría.

Tabla 7. Resultados de la superficie específica de la muestra de partículas metálicas de Ti6Al4V.

Ensayo	Área superficie específica (m ² /g) (DT)	C	Coefficiente de correlación
1	0.3893 (0.0212)	23.21	0.9998
2	0.3550 (0.0316)	24.82	0.9997
3	0.2441 (0.0165)	22.07	0.9998

C: constante BET; DT: desviación típica.

Granulometría

En la Figura 21 se muestra la distribución de Gaussiana de las partículas metálicas, característica de los procesos de fricción y mecanizado. El diámetro equivalente de la partícula fue de 159 µm (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de la granulometría.

	Diámetro equivalente (µm)
Moda	152
Percentil 10	61
Percentil 50	159
Percentil 90	433

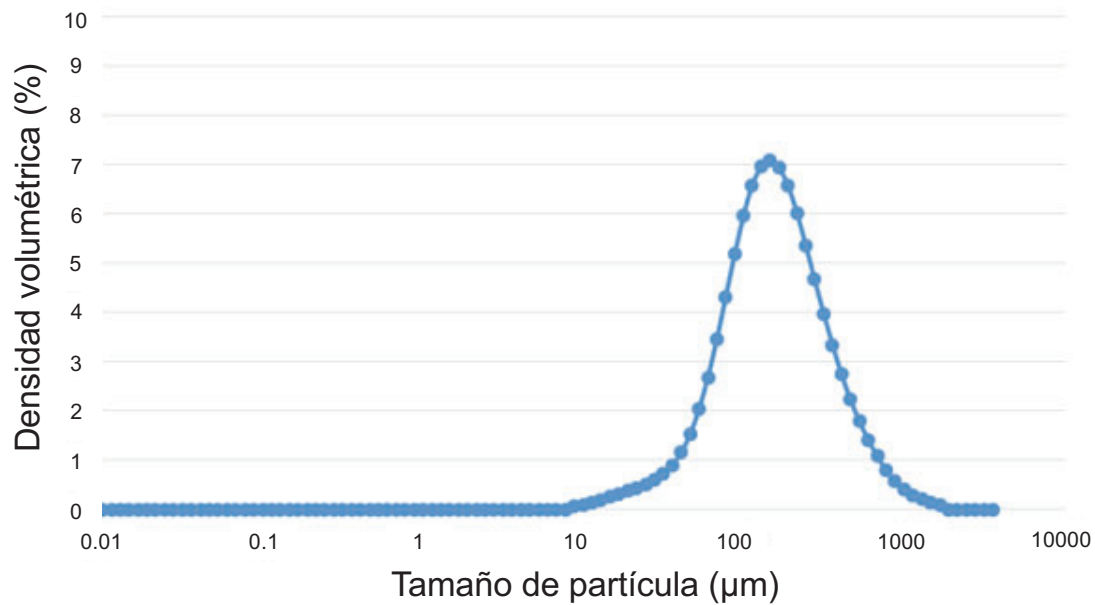


Figura 21. Distribución del tamaño de las partículas metálicas de la implantoplastia

Microscopía electrónica de barrido

Los residuos metálicos estudiados mostraron una morfología irregular y presentaron diferentes tamaños de partículas. La microscopía electrónica de barrido y el microanálisis de dispersión de energía de rayos X evidenciaron la ausencia de impurezas entre los restos metálicos de Ti6Al4V, así como la ausencia de restos de material abrasivo o de hierro procedentes del desgaste de las fresas. Aunque podría haber pequeñas cantidades de acero en las partículas, son indetectables con los dispositivos actuales debido a su escasez. Esta aparente ausencia de contaminación podría deberse a la dureza relativa del acero inoxidable martensítico en comparación con la aleación de Ti.

Los restos metálicos tenían una geometría aplanada con forma de escamas y claros signos de deformación plástica (Figura 22).

Por último, las micrografías mostraban bandas de deslizamiento que revelaban las microestructuras de placa Widmanstätten de la aleación Ti6Al4V, lo que indicaba que el material había absorbido una gran deformación.

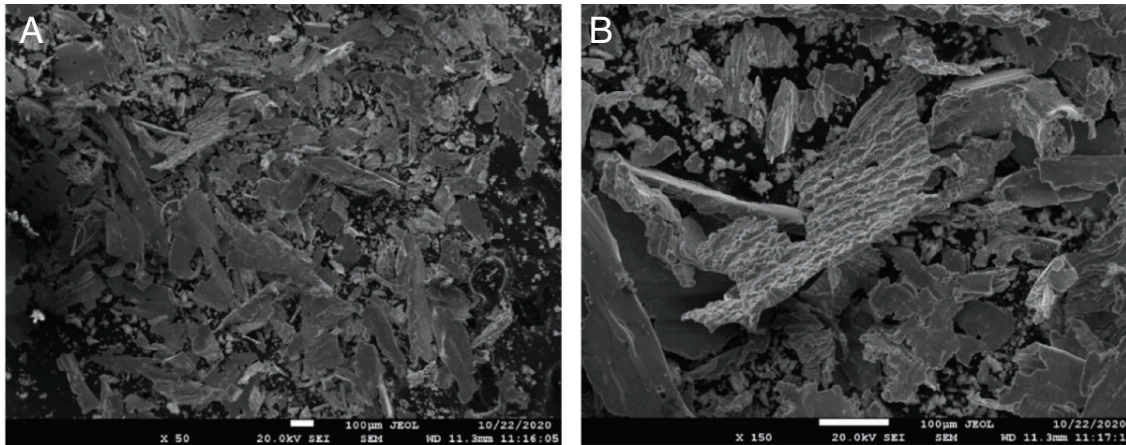


Figura 22. Imágenes de microscopía electrónica bajo distintas magnificaciones: A) x50 y B) x150.

Liberación de iones

La Figura 23 muestra las curvas de liberación de iones de Ti, Al y V en el medio líquido con solución de Hank en función del tiempo de incubación.

Comparativamente, la liberación de los iones Ti y Al fue más lenta que la de los iones V. Los iones de V mostraron una rápida liberación en las primeras 24 horas, mientras que entre el día 1 y el día 7 la tasa de liberación se redujo, pero luego aumentó entre el día 7 y el día 21. La liberación de los iones V no se estabilizó con el tiempo de incubación. En cambio, los iones de Al mostraron una liberación bastante constante entre los 0 y los 21 días. Por último, los iones de Ti mostraron una liberación constante entre el día 0 y el día 7. Entre el día 7 y el día 14 hubo un ligero aumento en la liberación de iones, mientras que entre el día 14 y el día 21 se estabilizó.

El V es un elemento que favorece la fase beta y es la fase que se corroe más fácilmente en el entorno fisiológico. Esta es una posible razón de la elevada liberación de V al medio.

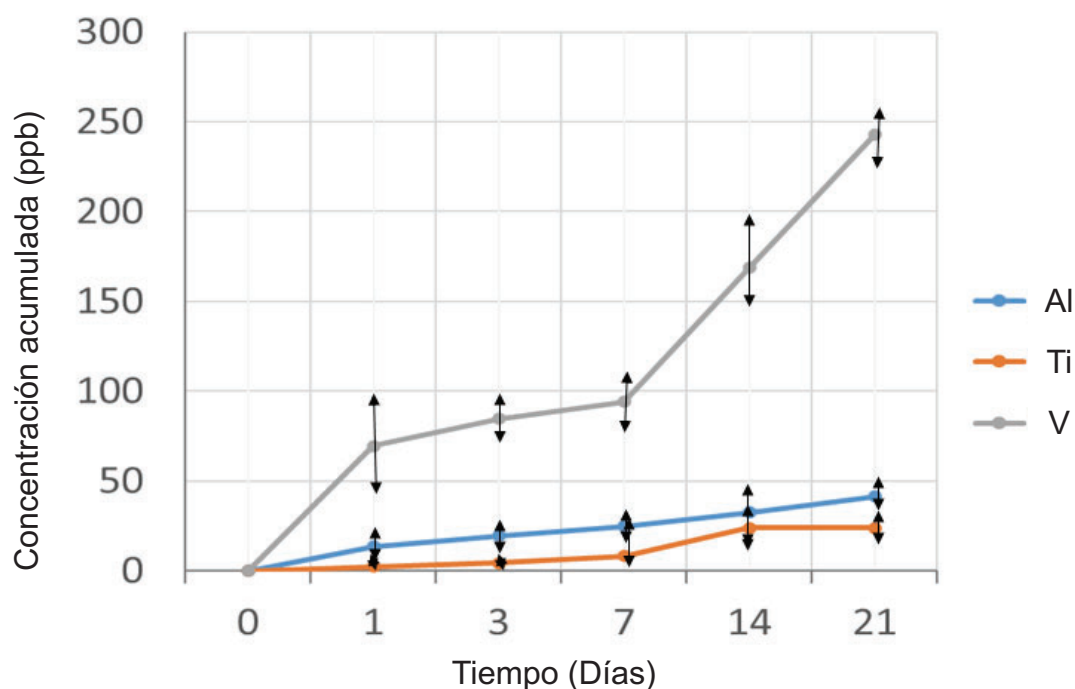


Figura 23. Curva de liberación de iones de Ti, Al y V en función del tiempo de exposición.

Difracción de rayos X

El espectro de difracción del polvo analizado se presenta en la Figura 24, representándose el número de cuentas (intensidad de pico) versus el ángulo de difracción (2θ).

El análisis de los resultados del espectro de difracción mediante el software DIFFRAC.EVA (Bruker, Karlsruhe, Alemania) y la base de datos internacional de difracción "Joint Committee on Powder Diffraction Standards" reveló la presencia de dos fases: una correspondiente a la aleación Ti-Al con referencia (01-077-6855 Al₃Ti₁₇ Y0. 1) "Aluminio Titanio" y la otra correspondiente a la fase beta de la aleación Ti₆Al₄V. Estos resultados podrían reflejar que la aleación Ti₆Al₄V estudiada presentaba dos fases: la fase alfa con un porcentaje superior al 95 % y la fase beta que fue aproximadamente del 5 %.

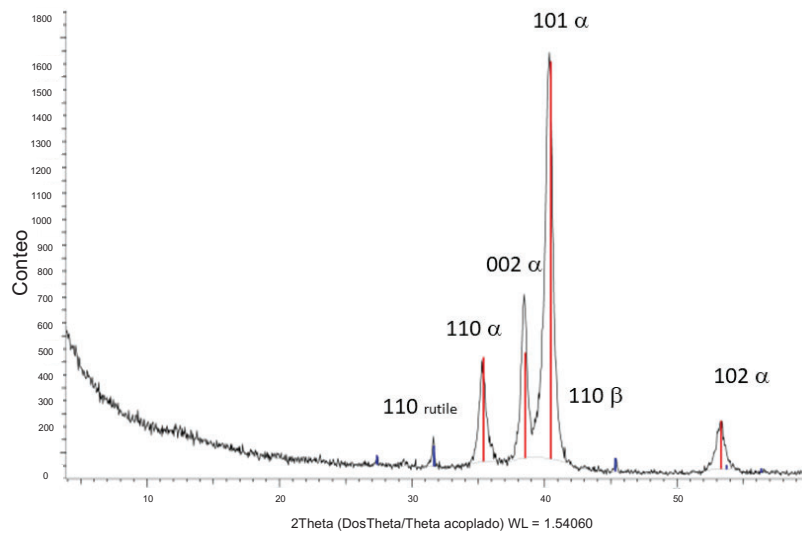


Figura 24. Espectro de difracción de rayos x de las partículas metálicas de la implantoplastia.

Tensiometría

Hubo diferencias importantes en los perfiles de sorción entre las muestras (Figura 25). Estas diferencias eran indicativas de la heterogeneidad en el tamaño de las partículas, que puede alterar significativamente la constante capilar del polvo entre diferentes muestras. Por lo tanto, la determinación del ángulo de contacto mediante esta técnica parece poco plausible.

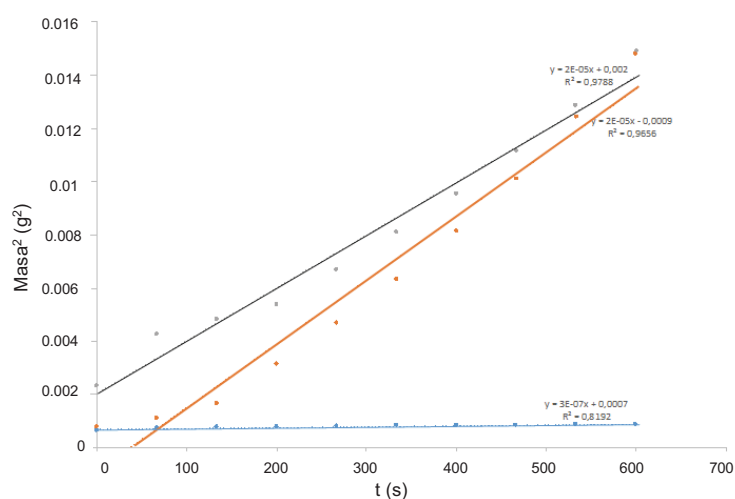


Figura 25. Representación de la sorción (aumento de masa en función del tiempo) de distintas muestras obtenidas a través de la implantoplastia de implantes dentales de Ti6Al4V.

Citotoxicidad

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad expresados como porcentaje de supervivencia celular se ilustran en la Figura 26. Las células se adhirieron a la placa de sustrato y presentaron la morfología esperada, tanto antes como después de la incubación con los extractos.

La muestra evaluada mostró efectos citotóxicos tanto en los ensayos de células osteoblásticas como de fibroblastos en el extracto completo (sin diluir). En cambio, no mostró efectos citotóxicos en los extractos diluidos (1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000). En estos extractos los resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.1$).

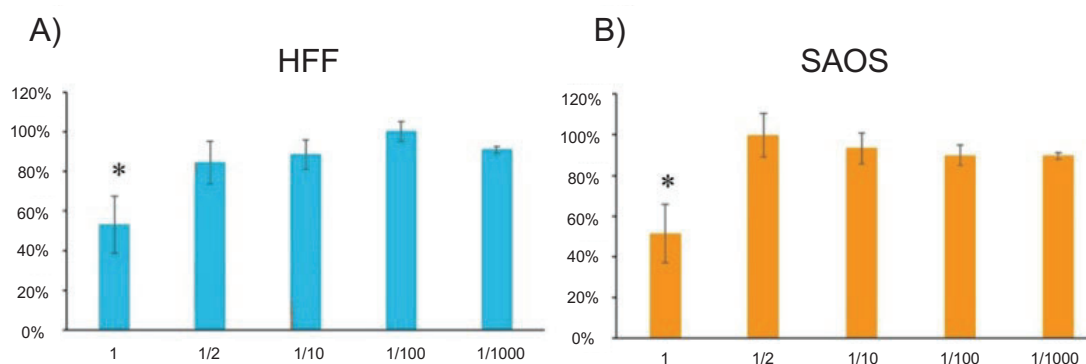


Figura 26. Viabilidad celular en el ensayo de citotoxicidad con las células HFF-1 (A) y SAOS-2 (B). * Significa que la muestra tuvo efectos citotóxicos (< 70 % de la viabilidad celular).

Artículo original

Article

Physicochemical and Biological Characterization of Ti6Al4V Particles Obtained by Implantoplasty: An In Vitro Study. Part I

Jorge Toledano-Serrabona ¹, Francisco Javier Gil ^{2,3,*}, Octavi Camps-Font ¹, Eduard Valmaseda-Castellón ¹, Cosme Gay-Escoda ¹ and Maria Ángeles Sánchez-Garcés ^{1,*}

¹ Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Department of Oral Surgery and Implantology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, 08907 Barcelona, Spain; jorgetoledano25@gmail.com (J.T.-S.); ocamps@ub.edu (O.C.-F.); eduardvalmaseda@ub.edu (E.V.-C.); cgay@ub.edu (C.G.-E.)

² Bioengineering Institute of Technology, International University of Catalonia, 08195 Barcelona, Spain

³ Faculty of Dentistry, International University of Catalonia, 08195 Barcelona, Spain

* Correspondence: xavier.gil@uic.es (F.J.G.); masanchezg@ub.edu (M.Á.S.-G.)



Citation: Toledano-Serrabona, J.; Gil, F.J.; Camps-Font, O.; Valmaseda-Castellón, E.; Gay-Escoda, C.; Sánchez-Garcés, M.Á. Physicochemical and Biological Characterization of Ti6Al4V Particles Obtained by Implantoplasty: An In Vitro Study. Part I. *Materials* **2021**, *14*, 6507. <https://doi.org/10.3390/ma14216507>

Academic Editor: Alessandro Vichi

Received: 13 September 2021

Accepted: 25 October 2021

Published: 29 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Implantoplasty is a mechanical decontamination technique that consists of polishing the supra-osseous component of the dental implant with peri-implantitis. This technique releases metal particles in the form of metal swarf and dust into the peri-implant environment. In the present in vitro study, the following physicochemical characterization tests were carried out: specific surface area, granulometry, contact angle, crystalline structure, morphology, and ion release. Besides, cytotoxicity was in turn evaluated by determining the fibroblastic and osteoblastic cell viability. As a result, the metal debris obtained by implantoplasty presented an equivalent diameter value of 159 µm (range 6–1850 µm) and a specific surface area of 0.3 m²/g on average. The particle had a plate-like shape of different sizes. The release of vanadium ions in Hank's solution at 37 °C showed no signs of stabilization and was greater than that of titanium and aluminum ions, which means that the alloy suffers from a degradation. The particles exhibited cytotoxic effects upon human osteoblastic and fibroblastic cells in the whole extract. In conclusion, metal debris released by implantoplasty showed different sizes, surface structures and shapes. Vanadium ion levels were higher than those of the other metal ions, and cell viability assays showed that these particles produce a significant loss of cytocompatibility on osteoblasts and fibroblasts, which means that the main cells of the peri-implant tissues might be injured.

Keywords: dental implant; peri-implantitis; titanium alloy; implantoplasty

1. Introduction

Titanium (Ti) is a transition metal with a metallic color and high chemical stability. Several metals, such as aluminum, vanadium, molybdenum, etc., can be added to Ti to improve its mechanical properties. Commercially pure (c.p.) Ti or Ti alloy are commonly used in dental implants and orthopedics (joint replacement) due to their corrosion resistance, biocompatibility, and mechanical properties [1]. Among the different Ti alloys, Ti6Al4V is the most commonly used and is applied in a wide range of applications such as dental implants, orthopedic prostheses, chemical industry, aerospace industry, etc. This alloy is easy to manufacture and has excellent corrosion resistance and biocompatibility as a stable, continuous, and inert oxide layer is established [2]. However, there are some concerns related to the usage of Ti6Al4V in the long term. The first is that several studies report that shear or wear debris from this alloy can trigger an inflammatory reaction that can lead to osteolysis and loss of the prosthesis. Another issue of this alloy is of potential V ion releasing, which can be toxic to the human body [3,4]. Besides, this alloy has some disadvantages such as low surface hardness, low fatigue strength, low wear properties and high coefficient of friction [5]. Taking into consideration the above-mentioned disadvantages,

other alloys such as Ti-Zr, Ti-6Al-7Nb or others have been proposed to overcome these limitations, but there is still not enough long-term data [3,6].

Since Brånemark first described osseointegration [7], titanium (Ti) dental implants have proven to be a predictable therapeutic option for rehabilitating edentulous or partially edentulous patients. Although the success rate of dental implants exceeds 94% after 10 years [8], biological, mechanical, and esthetic complications may occur after oral rehabilitation [9].

Mucositis and peri-implantitis are bacterial plaque-induced inflammatory conditions that affect the tissues surrounding dental implants [10]. Dissimilar to mucositis, peri-implantitis is characterized by the presence of inflammatory signs with progressive marginal bone loss [11]. The frequency of peri-implant disease is high, with a reported prevalence of peri-implantitis of 12.8% at implant level and 18.5% at patient level [12].

Different surgical approaches, such as access surgery, resective surgery, regenerative surgery, or a combination of these, have been suggested for the treatment of peri-implantitis [13]. After resective surgery, the rough surface of the implant may be exposed to the oral environment. In these cases, implantoplasty (IP) has been described to decontaminate the supracrestal component of the implant, hinder bacterial adhesion and facilitate hygiene [14]. Implantoplasty consists of polishing the implant surface that has been uncovered by the loss of peri-implant bone height [15]. During IP there is a large release of metal particles into the peri-implant tissue as a result of a drilling process. After peri-implant surgery, often these metal particles cannot be completely removed from the bone and mucosal tissue around the implant. Several studies suggest that Ti particles released into the peri-implant tissue could trigger peri-implant bone loss [16–18]. Furthermore, Soto-Alvaredo et al. [19] found that Ti nanoparticles and ions exert a cytotoxic effect upon human enterocytes and murine osteoblasts. However, the impact of such metal debris released during IP on a living organism remains unclear.

Although IP has been used as a technique for mechanical decontamination of the dental implant with peri-implantitis, the physicochemical and mechanical properties, as well as the cytotoxicity of metal debris released during this procedure has not been addressed in detail. Thus, it is crucial to analyze these properties of the Ti6Al4V particles released during IP in order to understand the cellular and biological behavior of these particles [20]. Indeed, there are still important parameters to be determined, for example the specific surface area, nanoindentation or cytotoxic effects of such metal debris upon osteoblasts and fibroblasts.

The main objective of this *in vitro* study was to analyze the physicochemical properties of the metal debris released after IP of Ti alloy (Ti6Al4V) dental implants. In addition, as a secondary objective, the cytotoxicity of these metal particles was evaluated by assessing the cell viability of human fibroblasts and osteoblasts, as they are the main cells of the peri-implant tissues.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Preparation and Collection

Implantoplasty of 60 Ti6Al4V dental implants (Avinent Implant System S.L., Santpedor, Spain) was carried out by the same investigator (J.T.-S.) following the drilling protocol described in the study published by Costa-Berenguer et al. [21]. Using a GENTLEsilence LUX 8000B turbine (KaVo Dental GmbH, Biberach an der Riß, Germany) under constant irrigation, the surface was sequentially modified with a fine-grained tungsten carbide bur (reference H379.314. 014 KOMET; GmbH & Co., KG, Lemgo, Germany), a coarse-grained silicon carbide polisher (order no. 9608.314.030 KOMET; GmbH & Co., KG, Lemgo, Germany) and a fine-grained silicon carbide polisher (order no. 9618.314.030 KOMET; GmbH & Co., KG, Lemgo, Germany). The samples were lyophilized to remove the water from the metal debris released during IP. Once 10 g of Ti6Al4V powder was obtained, the physicochemical characterization and cytotoxicity studies were carried out. Ti6Al4V studied was Extra Low Interstitial (ELI) being in atomic percentage: 5.9% Al, 3.9% V,

Fe < 0.03%, C < 0.01%, O < 0.01%, Ti balance. The chemical analysis was realized by EDS microanalysis.

2.2. Specific Surface Area

The specific surface area analysis was carried out using ASAP 2020 equipment (Micromeritics, Norcross, GA, USA). Nitrogen was used as an adsorbate. The metal debris obtained was degassed at 100 °C under vacuum conditions (10 µm Hg). The specific surface area was analyzed by applying mathematical calculations described by the BET (Brunauer–Emmett–Teller) theory [22]. An analysis of the specific surface area was carried out in triplicate.

2.3. Granulometry

The particle size of the metal debris was measured using the Mastersizer 3000 (Malvern Panalytical, Malvern, UK). This unit uses the laser diffraction technique to measure particle size by measuring the intensity of scattered light as a laser beam passes through the sample of particles. This test was carried out in a wet medium, using ethanol as the liquid scattering medium, and with the necessary amount of metal debris to bring the scattering obscuration and the sample within the optimum range of 5% to 10%, which was finally adjusted to 7%. The particle size range that can be analyzed with this equipment is between 10 nm and 3.5 mm. Mechanical and ultrasonic agitation methods (2500 rpm and 50% sonication, respectively) were used to avoid possible agglomeration of the metal debris during the particle size test.

To perform the particle size test, the refractive index of the Ti to be analyzed must be specified. For this purpose, an X-ray diffraction test was carried out. The anatase phase value was chosen, with a refractive index of 2.51.

2.4. Scanning Electron Microscopy

The morphology of the obtained particles was evaluated by scanning the electron microscopy (SEM) using the Phenom XL Desktop SEM microscope (PhenomWorld, Eindhoven, The Netherlands) with an accelerating voltage of 20 keV. The particles were placed on a conductive adhesive carbon tape in order to improve the images.

2.5. Ion Release

The release of metal ions from the sample into the medium was evaluated according to ISO 10993-12-2009 [23]. In accordance with the standard, a medium/powder ratio of 1 mL per 0.2 g of sample was used. A total of 3 samples ($n = 3$) were prepared for analysis (10 mL of medium and 2 g of metal debris per sample). The liquid medium used for ion release was Hank's saline solution (Sigma-Aldrich, Co., Life Science, St. Louis, MO, USA), which, being certified and commercially available, ensures homogeneity. The liquid in contact with the metal debris was recovered and filtered through a filter of pore size 0.22 µm. For analysis, it was acidified with 2% nitric acid (HNO₃ 69.99%, Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) to avoid precipitation of the metal ions prior to the measurement of their concentration by inductively coupled plasma emission mass spectrometry (ICP-MS).

The samples were extracted at 5 timepoints: 1, 3, 7, 14 days and 21 days, as in similar studies [24]. The samples were stored at 37 °C in an incubator oven and were shaken at 250 rpm with an inclination angle of 30° to avoid settling of the metal debris during the assay and to ensure continuous exposure of all particles of the powder samples to the medium.

The samples were analyzed by ICP-MS (Perkin Elmer Elan 6000, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA). This technique enables a quantitative multi-elemental analysis with an accuracy of 1 ppt for 90% of the elements of the periodic table.

2.6. X-ray Diffraction

X-ray diffraction analysis was carried out with a diffractometer (XRD; D8 Advance; Bruker, Karlsruhe, Germany) equipped with a germanium crystal and a Cu K α anode. The system was operated at 40 kV and 40 mA.

A total of 1 cm³ of metal debris was used for the analysis. Data were obtained between 10° and 60° with a step size of 0.02° and time of 1 s per step. Phase determination and identification was performed using DIFFRAC.EVA software (Bruker, Karlsruhe, Germany). X-ray diffraction allows for the determination of crystalline structures, as well as the phase of multiphase crystalline materials.

2.7. Tensiometry

Due to the characteristics of the sample, the possibility of analyzing the contact angle by liquid sorption measurements using a Wilhelmy balance has been investigated. Under normal conditions, with samples presenting a comparable capillary force between samples (a certain homogeneity in the powdered material), this technique allows calculation of the contact angle using the Washburn method [25]. According to this method, liquid is extracted through capillary action. The mass increase in the tube, which is suspended from a force sensor, is determined with respect to time during the measurement. If the bulk metal debris is considered to constitute a capillary bundle, then the process can be described by the Washburn equation as follows:

$$\frac{m^2}{t} = \frac{c \cdot \rho^2 \cdot \sigma \cdot \cos \theta}{\eta} \quad (1)$$

m = mass; t = sorption time; σ = surface tension of the liquid; c = capillary constant of the powder; ρ = density of the liquid; θ = contact angle; η = viscosity of the liquid.

The constant c includes the number of microcapillaries and their mean radius; it also depends on the nature of the powder and that of the measuring tube.

Sorption measurements of Ti metal debris were performed with a Krüss Processor Tensiometer K100 (Krüss Scientific Instruments, Matthews, CA, USA) using a specific accessory for sorption tests. Milli-Q water was used as the wetting liquid.

2.8. Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity of the sample was evaluated by indirect exposure determination according to ISO 10993-5 [26].

The cytotoxicity assays were performed in triplicate ($n = 3$), the samples studied being: test sample (Ti6Al4V metal debris), positive control (cells seeded directly onto the plate), and negative control: medium without cells.

The samples were handled aseptically throughout the assay. The cytotoxicity test consists of evaluating the percentage cell survival of a known cell line when exposed to the medium that has been in contact with a given material. In this case, an indirect contact cytotoxicity test was performed according to the guidelines specified in ISO 10993-5 “Biological evaluation of medical devices”, part 5 “In vitro cytotoxicity tests”. To quantify cytotoxicity, the cell survival rate, which indicates cytotoxicity if <70%, was calculated.

Since these metal particles are in contact with both bone and soft tissue, two human cell lines were used: SAOS-2 osteoblastic (ATCC[®] HTB-85) and HFF-1 fibroblastic cells (ATCC[®] SCRC-1041). The cells were stored with dimethyl sulfoxide as cryopreservative at −180 °C and were assayed bimonthly for the absence of mycoplasma.

Cells were cultured in a humidity-controlled incubator with 5% of CO₂ supply. As recommended by the manufacturer, McCoy’s Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used for SAOS-2 culture and Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% L-glutamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA) was used for HFF-1 culture. The medium was stored at 4 °C, and the supplements at −20 °C.

The extracts were assayed according to Section 8.2 of ISO 10993-5. To do so, the material was incubated in supplemented medium at a ratio of 1 mL per 0.2 g of sample, for 72 h at 37 °C. Cells were seeded at a density of 2–10⁴ cells/mL for 24 h before contact with the sample extracts.

Cells were incubated for 24 h with undiluted extract (the whole extract without dilution) and 1/2, 1/10, 1/100 and 1/1000 of diluted extract, using complete medium for dilutions. Cells were inspected for adhesion and morphology before and after contact with the extracts. Once the assay was completed, cells were lysed with Mammalian Protein Extraction Reagent (mPER), and cell viability was assessed as lactate dehydrogenase enzyme activity (LDH; Roche Applied Science, Penzberg, Germany). The viability was calculated according to the manufacturer's recommendations, measuring absorbance at 492 nm.

2.9. Statistical Analysis

Specific surface area was carried out in triplicate. Data were recorded using a Microsoft Excel spreadsheet (Microsoft®, Redmond, Washington, DC, USA) and subsequently processed with the Stata 14 package (StataCorp®, College Station, TX, USA). Means and standard deviations were calculated, except for the granulometry test, where the mode and percentiles were used.

3. Results

3.1. Specific Surface Area

The samples of the metal particles showed specific surface area values ranging from 0.2 to 0.4 m²/g (Table 1). This range is explained by the dispersion of the sizes of the metal debris studied, as shown by the granulometry results.

Table 1. Results of the specific surface area of the sample of Ti6Al4V powder.

Assay	Specific Surface Area (m ² /g) (SD)	C	Correlation Coefficient
1	0.3893 (0.0212)	23.21	0.9998
2	0.3550 (0.0316)	24.82	0.9997
3	0.2441 (0.0165)	22.07	0.9998

Abbreviations: C = BET constant, SD = standard deviation.

3.2. Granulometry

As depicted in Figure 1, the particle distribution exhibited a Gaussian distribution, typical of friction and machining processes. The equivalent particle diameter was 159 µm (range 6–1850 µm) (Table 2).

3.3. Scanning Electron Microscopy

The morphology of the particles was irregular, exhibiting different particle sizes. Scanning electron microscopy and X-ray energy dispersive microanalysis evidenced no impurities within the Ti6Al4V metal debris, as well as the absence of any traces of abrasive material or iron coming from the wear of the burs. Although there might be small amounts of steel in the particles, they are undetectable with current means because of their scarcity. This apparent absence of contamination might be due to the relative hardness of martensitic stainless steel in comparison with titanium alloy, which keeps frictional damage to the steel and steel wear to a minimum.

The metal debris had a flattened geometry with a “flake” shape and clear signs of plastic deformation (Figure 2).

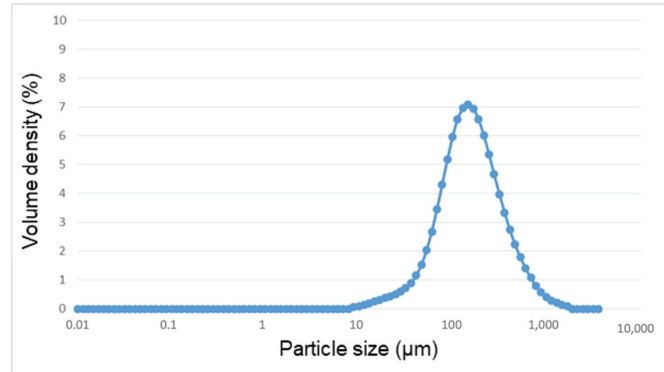


Figure 1. Distribution of particle size of the metal debris after implantoplasty.

Table 2. Granulometry results of the Ti6Al4V powder.

	Equivalent Diameter (μm)
Mode	152
10th percentile	61
50th percentile	159
90th percentile	433

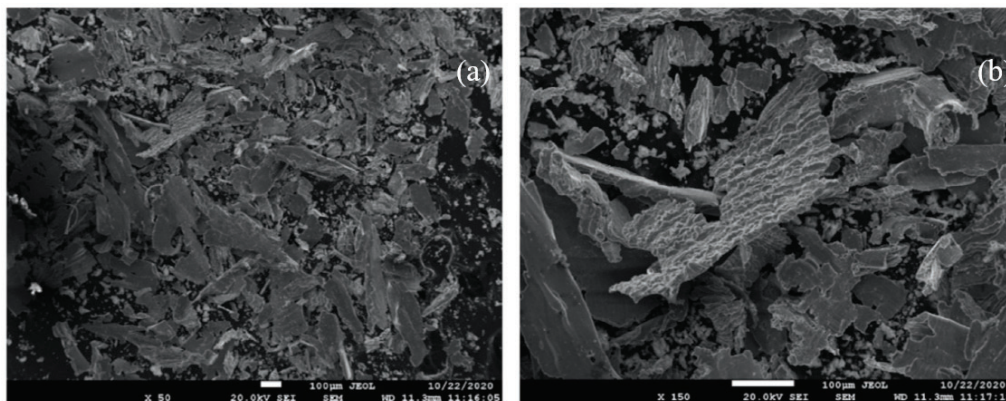


Figure 2. Scanning electron microscopy images under different magnifications; (a) $\times 50$, (b) $\times 150$.

Finally, the micrographs exhibited slip bands, revealing the Widmanstätten plate microstructures of the Ti6Al4V alloy, indicating that the material absorbed a large deformation.

3.4. Ion Release

Figure 3 shows the release curves of titanium (Ti), aluminum (Al), and vanadium (V) ions into the liquid medium with Hank's solution as a function of incubation time.

Comparatively, the release of Ti and Al ions was slower than that of V ions. Vanadium ions exhibited rapid release in the first 24 h, while between day 1 and day 7 the release rate slowed down, but then further increased between day 7 and day 21. The release of V ions did not stabilize with incubation time; in contrast, Al ions showed a fairly constant release rate between 0 days and 21 days. Finally, Ti ions showed a constant release between day 0 and day 7. Between day 7 and day 14 there was a slight increase in the release rate, and between day 14 and 21 it was seen to have stabilized.

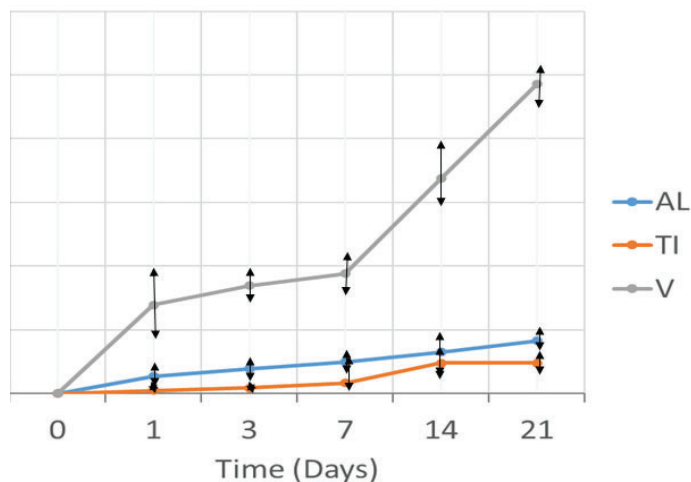


Figure 3. Titanium (Ti), Aluminum (Al), and Vanadium (V) ion release curve as a function of exposure time.

Vanadium is an element that favors the beta phase and is the phase that corrodes most easily in the physiological environment. This is the reason for the high release of vanadium into the environment.

3.5. X-ray Diffraction

The diffraction spectrum of the analyzed metal debris is presented in Figure 4, plotting the number of beads (peak intensity) versus the diffraction angle (2θ).

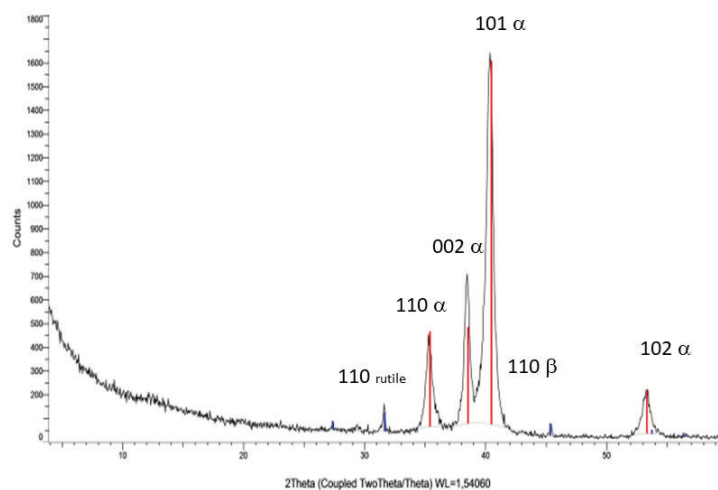


Figure 4. X-ray diffraction spectrum of the metal debris.

The analysis of diffraction spectrum results using DIFFRAC.EVA software (Bruker, Karlsruhe, Germany) in conjunction with the international diffraction database “Joint Committee on Powder Diffraction Standards” revealed the presence of two phases: one corresponding to the Ti-Al alloy with reference (01-077-6855 Al₃Ti₁₇ Y0. 1) “Aluminum Titanium” and the other corresponding to beta phase of the Ti6Al4V alloy. This might reflect that the Ti6Al4V alloy studied presented two phases: the alpha phase with a majority in a percentage > 95% and the beta phase which was approximately 5%.

3.6. Tensiometry

There were major differences in the sorption profiles between samples (Figure 5). These differences were indicative of the heterogeneity in particle sizes, which can significantly alter the capillary constant of the powder between different samples. Therefore, the determination of the contact angle using this technique seems unreliable.

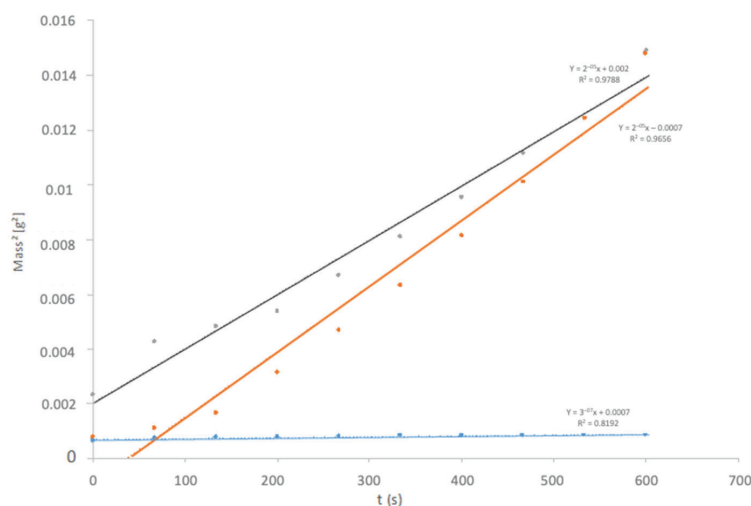


Figure 5. Representation of the sorption (mass increase as a function of time) of several samples of metal debris.

3.7. Cytotoxicity

The results of the cytotoxicity assay expressed as percentage cell survival are illustrated in Figure 6. The cells were adherent to the substrate plate and presented the expected morphology, both before and after incubation with the extracts.

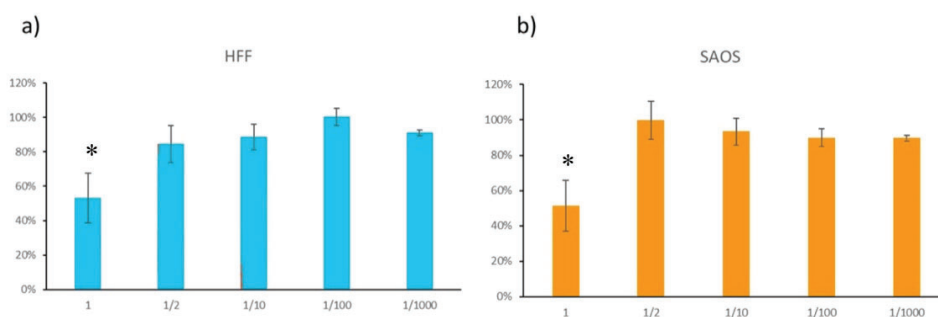


Figure 6. Cell viability in the cytotoxicity assay with HFF-1 (a) and SAOS-2 cells (b). * means that the sample had cytotoxic effect (loss of <70% of cell viability).

The sample under evaluation exhibited cytotoxic effects in both the osteoblastic and fibroblast cell assays in the whole extract (undiluted). In contrast, it showed no cytotoxic effects in the diluted extracts (1/2, 1/10, 1/100 and 1/1000). In these solutions, the results do not present statistical differences significance with $p < 0.1$. Osteoblasts and fibroblasts are the main cells in the peri-implant tissues. The loss of cytocompatibility is a bad indicator since it suggests that the main cells of the peri-implant environment may be compromised.

4. Discussion

The results of the physicochemical characterization indicate that the metal debris released by implantoplasty exhibits different sizes and shapes and releases a greater amount of V ions than Ti and Al ions. Furthermore, the cell viability assays showed this metal debris to produce a significant loss of cytocompatibility in fibroblastic and osteoblastic cells. However, as limitations, it must be pointed out that the analyses were performed on grade V dental implants, specifically on a Ti6Al4V alloy. Therefore, further studies are required to reproduce our methodology using pure Ti dental implants or other types of alloys such as Ti-Zr. On the other hand, although a previously described and published milling protocol was used in the present study [21], numerous milling protocols have been described in the literature for IP [27]. Therefore, not all possible waste products that are released when the technique is modified have been studied. Nevertheless, it should be noted that our results suggest that the release of waste products from the milling burs was negligible.

Most of the current dental implants have a surface treatment to increase their roughness, thus increasing bone-implant contact and accelerating the osseointegration process [28]. However, these surface modifications also facilitate bacterial adhesion and deposition, causing biological complications, and moreover make it difficult to decontaminate the implant surface when necessary. Indeed, the surface roughness of implants seems to have an impact upon the progression of peri-implantitis and the size of the initial peri-implant lesion [29]. Implantoplasty has been proposed in order to reduce this bacterial colonization, since it eliminates the threads (macrosurface) and reduces surface roughness [30].

Several mechanisms of release of Ti particles and ions have been described in dental implants: friction of the dental implant with the bone during placement, mechanical wear caused by surface decontamination, corrosion caused by chemical agents or substance released by bacteria or inflammatory cells [31–33]. Among the different decontamination methods, IP is the technique that generates the greatest amount of metal debris, much of which cannot be removed and remains within the soft tissues and bone after surgery [2]. The volume of metal particles released by implantoplasty depends on the amount of dental implant surface exposed to the oral environment, as well as the number of implants requiring IP [14,34,35]. A growing body of evidence suggests that Ti particles may influence bone remodeling and play an important role in the development of peri-implant marginal bone loss [16,31,32,36].

In the field of orthopedics and traumatology, total hip prostheses constitute a predictable rehabilitation treatment, with an 85% survival rate after a follow-up of 25 years [37]. Nevertheless, in the long term, the most common reason for failure is a periprosthetic osteolytic reaction caused by metal particles released during wear and produced by friction between the joint surfaces [38]. This condition is known as “metallosis” and can lead to aseptic loss of the prosthesis [39,40]. In this scenario, the tissue surrounding the prosthesis becomes filled with black particles resulting in large stains in the soft tissues, as well as in an increased presence of metal ions in the blood. Management implies the removal of the prosthesis, cleaning of the damaged area and placement—if possible—of a new prosthesis [38]. Although the exact immunopathological mechanisms underlying this phenomenon remain unclear, Obando-Pereda et al. [41] reported that macrophages in contact with detached Ti particles, secondary to joint prosthesis wear, expressed increased levels of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6). These cytokines, as well as reactive oxygen species (ROS), lysosomal enzymes or activation of the complement cascade, play an important role in bone metabolism and in the long-term viability of joint replacements [37,40,42].

The specific surface area of the metal debris ranged from 0.2 to 0.4 m²/g. These ranges of values are normal due to the size dispersion observed in the SEM images. These metal particles had a plate-like shape and exhibited a Widmanstätten pattern, indicating that the material had absorbed a large deformation [5,43].

X-ray diffraction testing showed the metal debris to be composed of an alpha phase corresponding to Ti-Al and a beta phase. This beta phase affords good mechanical properties to Ti and is generated by the presence of V [44]. In our sample, the release of Ti and

Al ions was low and stabilized over time. However, the release of V ions was greater and showed no signs of stabilization. This behavior of V has been observed in Orthodontics and Traumatology [2,3,39,45,46] and could be explained by its binding energy and solubility. The implications of this rapid release of V, without reaching saturation, remain unclear, since toxicity studies in the human body are not easy to carry out. Even so, the release of V ions is an undesired event, as it reflects degradation of the alloy. A recent systematic review reported that when Ti6Al4V is affected by corrosion or wear, the release of V and Al particles has a greater cytotoxic effect compared to commercially pure Ti [4]. However, the amounts of V ions in our sample were relatively small (parts per billion [ppb]).

In fact, Ti-6Al-7Nb alloy was introduced in orthopedics and traumatology because it was suggested that released V is toxic [3]. However, to date there is not enough clinical evidence to confirm that V is harmful; as a result, Ti6Al4V alloys continue to be used in both dentistry and traumatology. In this regard, it would be interesting to carry out a study of animal models to ascertain the targets of Ti, Al and V ions and also to study their effect with controlled doses.

The cell viability tests showed that in most dilutions the mean survival values were above 70%, which means that the metal debris was not cytotoxic. However, there was a significant loss of cytocompatibility in fibroblasts and osteoblasts in the non-diluted extract. Recently, Barrak et al. [20] carried out an in vitro experiment in which they demonstrated that the metabolic activity of human fibroblasts after exposure to metal debris from IP of Ti6Al4V implants decreased after day 10. This phenomenon did not occur when fibroblasts were exposed to Ti implants. Thus, although the evidence is scarce, clinicians should be aware of the material from which the implant is made before performing IP.

Finally, it is important to highlight that the immune system responds differently to different particle sizes of a given material [47]: large particles can be encapsulated by a fibrotic capsule to isolate them from the medium; medium-sized particles can be phagocytosed by macrophages and eliminated from the organism; small particles are not identified by the immune system [48]. Therefore, considering the size of the metal debris in our sample, all three responses can be expected.

5. Conclusions

Metal debris from implantoplasty presented an average equivalent diameter of 15 μm (range 6–1850 μm) and a specific surface area of 0.3 m^2/g on average. The particles in the studied sample were of plate morphology and presented different sizes. Furthermore, the release of Ti and Al ions was low and became saturated after 21 days, while the V ion release was considerably higher and did not seem to saturate during the study period.

Finally, the metal debris generated by implantoplasty produced a significant loss of cytocompatibility in fibroblastic and osteoblastic cells in the undiluted extract, which suggests that these metallic debris might damage the main cells of the peri-implant tissues.

Author Contributions: Conceptualization, J.T.-S., F.J.G. and M.Á.S.-G.; methodology, J.T.-S., F.J.G. and M.Á.S.-G.; formal analysis, O.C.-F.; writing—original draft preparation, J.T.-S., F.J.G.; writing—review and editing, M.Á.S.-G., E.V.-C., C.G.-E., F.J.G.; supervision, M.Á.S.-G.; project administration, E.V.-C., C.G.-E., F.J.G.; funding acquisition, M.Á.S.-G., E.V.-C., C.G.-E., F.J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the *Instituto de Salud Carlos III* through project PI20/01596 (co-funded by the European Regional Development Fund [ERDF], a way to build Europe). The work was also supported by the Spanish Government and the Ministry of Science and Innovation of Spain by research projects RTI2018-098075-B-C21 and RTI2018-098075-B-C22 (co-funded by the European Regional Development Fund [ERDF], a way to build Europe).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for institutional support. Dental implants were kindly provided by the Avinent Implant System, Santpedor, Spain.

Conflicts of Interest: Jorge Toledano-Serrabona has received no grants, personal fees, or non-financial support. F Javier Gil reports grants from the Spanish government, European Union personal fees, and non-financial support from Klockner Dental Implants (Barcelona, Spain). Octavi Camps-Font has participated as co-investigator in clinical trials sponsored by Mundipharma (Cambridge, UK) and Menarini Recherche (Florence, Italy). He also reports grants and non-financial support from Avinent (Santpedor, Spain). Eduard Valmaseda-Castellón reports personal fees and non-financial support from MozoGrau (Valladolid, Spain). He is the Director of the Avinent-University of Barcelona research agreement (Càtedra UB-Avinent), with Avinent (Santpedor, Spain), and has received personal fees from BioHorizons Ibérica (Madrid, Spain), Inibsa Dental (Llça de Vall, Spain) and Dentsply implants Iberia (Barcelona, Spain) outside the submitted work. In addition, Valmaseda-Castellón has participated as an investigator in clinical trials sponsored by Mundipharma (Cambridge, UK) and Geistlich (Wolhusen, Switzerland). Cosme Gay-Escoda reports grants, personal fees, and non-financial support from Mundipharma (Cambridge, UK) and Menarini Recherche (Florence, Italy). María Ángeles Sánchez-Garcés reports grants, personal fees, and non-financial support from Nobel Biocare, Zimmer and Menarini Recherche (Florence, Italy).

References

1. Markowska-Szczupak, A.; Endo-Kimura, M.; Paszkiewicz, O.; Kowalska, E. Are titania photocatalysts and titanium implants safe? Review on the toxicity of titanium compounds. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 2065. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Costa, B.C.; Tokuhara, C.K.; Rocha, L.A.; Oliveira, R.C.; Lisboa-Filho, P.N.; Costa Pessoa, J. Vanadium ionic species from degradation of Ti6Al4V metallic implants: In vitro cytotoxicity and speciation evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *96*, 730–739. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Challa, V.S.; Mali, S.; Misra, R.D. Reduced toxicity and superior cellular response of preosteoblasts to Ti-6Al-7Nb alloy and comparison with Ti6Al4V. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101*, 2083–2089. [\[CrossRef\]](#)
4. Willis, J.; Crean, S.J.; Barrak, F.N. Is titanium alloy Ti-6Al-4 V cytotoxic to gingival fibroblasts-A systematic review. *Clin. Exp. Dent. Res.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
5. de Castro, M.C.B.; Couto, A.A.; Almeida, G.F.C.; Massi, M.; de Lima, N.B.; da Sobrinho, A.S.; Castagnet, M.; Xiavier, G.L.; Oliveira, R.R. The effect of plasma nitriding on the fatigue behavior of the Ti6Al4V alloy. *Materials* **2019**, *12*, 520. [\[CrossRef\]](#)
6. Brizuela-Velasco, A.; Pérez-Pevida, E.; Jiménez-Garrudo, A.; Gil-Mur, F.J.; Manero, J.M.; Punset-Fuste, M.; Chávarri-Prado, D.; Diéguez-Pereira, M.; Monticelli, F. Mechanical characterisation and biomechanical and biological behaviours of Ti-Zr binary-alloy dental implants. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 2785863. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Brånemark, P.I.; Hansson, B.O.; Adell, R.; Breine, U.; Lindstrom, J.; Hallen, O.; Ohman, A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.* **1977**, *16*, 1–132.
8. Moraschini, V.; Poubel, L.A.; Ferreira, V.F.; Barboza Edos, S. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: A systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2015**, *44*, 377–388. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Pjetursson, B.E.; Heimisdottir, K. Dental implants-Are they better than natural teeth? *Eur. J. Oral Sci.* **2018**, *126*, 81–87. [\[CrossRef\]](#)
10. Berglundh, T.; Armitage, G.; Araujo, M.G.; Avila-Ortiz, G.; Blanco, J.; Camargo, P.M.; Chen, S.; Cochran, D.; Derks, J.; Figuero, E.; et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, 286–291. [\[CrossRef\]](#)
11. Schwarz, F.; Derks, J.; Monje, A.; Wang, H.L. Peri-implantitis. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, 246–266. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Rakic, M.; Galindo-Moreno, P.; Monje, A.; Radovanovic, S.; Wang, H.L.; Cochran, D.; Sculean, A.; Canullo, L. How frequent does peri-implantitis occur? A systematic review and meta-analysis. *Clin. Oral Investig.* **2018**, *22*, 1805–1816. [\[CrossRef\]](#)
13. Chan, H.L.; Lin, G.H.; Suarez, F.; MacEachern, M.; Wang, H.L. Surgical management of peri-implantitis: A systematic review and meta-analysis of treatment outcomes. *J. Periodontol.* **2014**, *85*, 1027–1041. [\[CrossRef\]](#)
14. Monje, A.; Pons, R.; Amerio, E.; Wang, H.L.; Nart, J. Resolution of peri-implantitis by means of implantoplasty as adjunct to surgical therapy: A retrospective study. *J. Periodontol.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
15. Figuero, E.; Graziani, F.; Sanz, I.; Herrera, D.; Sanz, M. Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontol.* **2000** **2014**, *66*, 255–273. [\[CrossRef\]](#)
16. Fretwurst, T.; Nelson, K.; Tarnow, D.P.; Wang, H.L.; Giannobile, W.V. Is metal particle release associated with peri-implant bone destruction? An emerging concept. *J. Dent. Res.* **2018**, *97*, 259–265. [\[CrossRef\]](#)
17. Albrektsson, T.; Canullo, L.; Cochran, D.; De Bruyn, H. “Peri-implantitis”: A complication of a foreign body or a man-made “disease”. Facts and fiction. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2016**, *18*, 840–849. [\[CrossRef\]](#)
18. Canullo, L.; Schlee, M.; Wagner, W.; Covani, U. International brainstorming meeting on etiologic and risk factors of peri-implantitis, montegrotto (Padua, Italy), august 2014. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2015**, *30*, 1093–1104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

19. Soto-Alvaredo, J.; Blanco, E.; Bettmer, J.; Hevia, D.; Sainz, R.M.; López Chaves, C.; Sánchez, C.; Llopis, J.; Sanz-Medel, J.; Montes-Bayón, M. Evaluation of the biological effect of Ti generated debris from metal implants: Ions and nanoparticles. *Metallomics* **2014**, *6*, 1702–1708. [\[CrossRef\]](#)
20. Barrak, F.N.; Li, S.; Muntane, A.M.; Jones, J.R. Particle release from implantoplasty of dental implants and impact on cells. *Int. J. Implant. Dent.* **2020**, *6*, 1–9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Costa-Berenguer, X.; García-García, M.; Sánchez-Torres, A.; Sanz-Alonso, M.; Figueiredo, R.; Valmaseda-Castellón, E. Effect of implantoplasty on fracture resistance and surface roughness of standard diameter dental implants. *Clin. Oral Implants Res.* **2018**, *29*, 46–54. [\[CrossRef\]](#)
22. Brunauer, S.; Emmett, P.H.; Teller, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309–319. [\[CrossRef\]](#)
23. ISO. 10993-12, *Biological Evaluation of Medical Devices. Part 12: Sample Preparation and Reference Materials*; ISO: Geneva, Switzerland, 2012.
24. Gutensohn, K.; Beythien, C.; Bau, J.; Fenner, T.; Grewe, P.; Koester, R.; Padmanaban, K.; Kuehn, P. In vitro analyses of diamond-like carbon coated stents: Reduction of metal ion release, platelet activation, and thrombogenicity. *Thromb. Res.* **2000**, *99*, 577–585. [\[CrossRef\]](#)
25. Washburn, W.E. The dynamics of capillary flow. *Phys. Rev.* **1921**, *17*, 273–283. [\[CrossRef\]](#)
26. ISO. 10993-5, *Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5. Test for In Vitro Cytotoxicity*; ISO: Geneva, Switzerland, 2009.
27. Ramel, C.F.; Lüssi, A.; Özcan, M.; Jung, R.E.; Hämmerle, C.H.F.; Thoma, D.S. Surface roughness of dental implants and treatment time using six different implantoplasty procedures. *Clin. Oral Implants Res.* **2016**, *27*, 776–781. [\[CrossRef\]](#)
28. Wennerberg, A.; Albrektsson, T.; Chrcanovic, B. Long-term clinical outcome of implants with different surface modifications. *Eur. J. Oral Implantol.* **2018**, *11*, 123–136.
29. Berglundh, T.; Gottfredsen, K.; Zitzmann, N.U.; Lang, N.P.; Lindhe, J. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: An experimental study in dogs. *Clin. Oral Implants Res.* **2007**, *18*, 655–661. [\[CrossRef\]](#)
30. Lang, N.P.; Berglundh, T.; Heitz-Mayfield, L.J.; Pjetursson, B.E.; Salvi, G.E.; Sanz, M. Consensus statements and recommended clinical procedures regarding implant survival and complications. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2004**, *19*, 150–154.
31. Schliephake, H.; Sicilia, A.; Al Nawas, B.; Donos, N.; Gruber, R.; Jepsen, S.; Milinkovic, I.; Mombelli, A.; Navarro, J.M.; Quirynen, M. Drugs and diseases: Summary and consensus statements of group 1. The 5th EAO Consensus Conference 2018. *Clin. Oral Implants Res.* **2018**, *29*, 93–99. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Mombelli, A.; Hashim, D.; Cionca, N. What is the impact of titanium particles and biocorrosion on implant survival and complications? A critical review. *Clin. Oral Implants Res.* **2018**, *29*, 37–53. [\[CrossRef\]](#)
33. Delgado-Ruiz, R.; Romanos, G. Potential causes of titanium particle and ion release in implant dentistry: A systematic review. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3585. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Bianchini, M.; Galarraga-Vinueza, M.; Bedoya, K.; Correa, B.; de Souza Magini, R.; Schwarz, F. Implantoplasty enhancing peri-implant bone stability over a 3-year follow-up: A case series. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* **2020**, *40*, 1–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Ramanauskaitė, A.; Schwarz, F.; Sader, R.; Becker, J.; Obreja, K. Assessment of peri-implant tissue dimensions following surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects. *Int. J. Implant. Dent.* **2021**, *7*, 4. [\[CrossRef\]](#)
36. Suárez-López del Amo, F.; Garaicoa-Pazmiño, C.; Fretwurst, T.; Castilho, R.M.; Squarize, C.H. Dental implants-associated release of titanium particles: A systematic review. *Clin. Oral Implants Res.* **2018**, *29*, 1085–1100. [\[CrossRef\]](#)
37. Holt, G.; Murnaghan, C.; Reilly, J.; Meek, R.M.D. The biology of aseptic osteolysis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2007**, *460*, 240–252. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Marshall, A.; Ries, M.D.; Paprosky, W. How prevalent are implant wear and osteolysis, and how has the scope of osteolysis changed since 2000? *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2008**, *16*, 1–6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Lohmann, C.H.; Singh, G.; Willert, H.-G.; Buchhorn, G.H. Metallic debris from metal-on-metal total hip arthroplasty regulates periprosthetic tissues. *World J. Orthop.* **2014**, *5*, 660–666. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Bitar, D.; Parvizi, J. Biological response to prosthetic debris. *World J. Orthop.* **2015**, *6*, 172–189. [\[CrossRef\]](#)
41. Obando-Pereda, G.A.; Fischer, L.; Stach-Machado, D.R. Titanium and zirconia particle-induced pro-inflammatory gene expression in cultured macrophages and osteolysis, inflammatory hyperalgesia and edema in vivo. *Life Sci.* **2014**, *97*, 96–106. [\[CrossRef\]](#)
42. Pajarinen, J.; Kouri, V.P.; Jämsen, E.; Li, T.F.; Mandelin, J.; Kontinen, Y.T. The response of macrophages to titanium particles is determined by macrophage polarization. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 9229–9240. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Farokhzadeh, K.; Edrisky, A. Fatigue improvement in low temperature plasma nitrided Ti6Al4V alloy. *Mater. Sci. Eng. A* **2015**, *620*, 435–444. [\[CrossRef\]](#)
44. Malinov, S.; Sha, W.; Guo, Z.; Tang, C.C.; Long, A.E. Synchrotron X-ray diffraction study of the phase transformations in titanium alloys. *Mater. Charact.* **2002**, *48*, 279–295. [\[CrossRef\]](#)
45. Gioka, C.; Bouraue, C.; Zinelis, S.; Eliades, T.; Silikas, N.; Eliades, G. Titanium orthodontic brackets: Structure, composition, hardness and ionic release. *Dent. Mater.* **2004**, *20*, 693–700. [\[CrossRef\]](#)
46. de Moraes, L.S.; Serra, G.G.; Albuquerque Palermo, E.F.; Andrade, L.R.; Müller, C.A.; Meyers, M.A.; Elias, C.N. Systemic levels of metallic ions released from orthodontic mini-implants. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **2009**, *135*, 522–529. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

-
47. Dalal, A.; Pawar, V.; Mcallister, K.; Weaver, C.; Hallab, N.J. Orthopedic implant cobalt-alloy particles produce greater toxicity and inflammatory cytokines than titanium alloy and zirconium alloy-based particles in vitro, in human osteoblasts, fibroblasts, and macrophages. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100*, 2147–2158. [[CrossRef](#)]
 48. Baranov, M.V.; Kumar, M.; Sacanna, S.; Thutupalli, S.; van den Bogaart, G. Modulation of immune responses by particle size and shape. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 607945. [[CrossRef](#)]

Estudio 2:

Propiedades mecánicas y comportamiento a la corrosión de las partículas de Ti6Al4V obtenidas por implantoplastia. Un estudio in vitro. Parte II.

- **Autores:** Toledano-Serrabona J, Sánchez-Garcés MÁ, Gay-Escoda C, Valmaseda-Castellón E, Camps-Font O, Verdeguer P, Molmeneu M, Gil FJ.
 - **Título:** Mechanical properties and corrosion behavior of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: An in vitro study. Part II.
 - **Revista:** Materials (Basel).
 - **Edición especial:** Synthesis and applications of novel dental implant materials
 - **Factor de impacto (2021):** 3.748
 - **Posición JCR (Metallurgy & Metallurgical Engineering):** 18/79 (Primer cuartil).
 - **Referencia completa:** Toledano-Serrabona J, Sánchez-Garcés MÁ, Gay-Escoda C, Valmaseda-Castellón E, Camps-Font O, Verdeguer P, Molmeneu M, Gil FJ. Mechanical properties and corrosion behavior of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: An in vitro study. Part II. Materials (Basel). 2021;14:6519.
 - **DOI:** 10.3390/ma14216519.
-

Objetivo

Analizar las propiedades mecánicas y la resistencia a la corrosión de las partículas metálicas generadas por implantoplastia.

Material y Método

Preparación de la muestra

Un único investigador (J.T-S.) hizo la implantoplastia de los implantes dentales de Ti6Al4V siguiendo el protocolo de fresado descrito en publicaciones anteriores (257,258). Se utilizó una turbina GENTLEsilence LUX 8000B (KaVo Dental GmbH, Biberach an der Riß, Alemania) con irrigación constante a temperatura ambiente. La superficie se modificó secuencialmente con una fresa de carburo de tungsteno de grano fino y dos pulidores, como se describe en la Parte I. La muestra se liofilizó para eliminar el agua de las partículas metálicas.

Microscopía electrónica de barrido y propiedades mecánicas

Como se ha descrito anteriormente en la Parte I, se determinó la morfometría de la muestra mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Los ensayos de nanoindentación se llevaron a cabo utilizando indentadores tipo “Berkovich”, con una velocidad de deformación constante de 0.05 s^{-1} . Se utilizó un equipo iMiro (KLAtercor) y un equipo Nanoindenter XP (MTS, Oak Ridge, EE.UU.) para determinar la dureza del implante dental sin modificar (control) y de las partículas metálicas, respectivamente.

Las tensiones residuales se midieron con un difractómetro que incorpora la configuración Bragg-Brentano (D500, Siemens, Alemania). Siguiendo la ley de Bragg se puede calcular la tensión superficial, ya que la difracción de rayos X permite determinar la distancia interplanar antes y después del granallado. Después del tratamiento, la distancia interplanar es menor debido a la compresión residual. Las

diferencias en la distancia interatómica determinan la microdeformación del material, que, junto con su módulo elástico, permite calcular la tensión residual en la superficie. Las mediciones se hicieron para la familia de planos, que difracta a $2\theta = 139.5^\circ$. Las constantes elásticas del Ti en la dirección de esta familia de planos son $EC = (E/1 + \nu) = 90.3 \text{ GPa}$ (314,315). Se evaluaron once ángulos ψ , 0° , cinco positivos y cinco negativos. La posición de los picos se ajustó con la función pseudo-Voigt utilizando el software WinplotR (de acceso libre en línea), y luego se convirtió en distancias interplanares ($d\psi$) utilizando la ecuación de Bragg. Los gráficos de $d\psi$ versus $\sin^2\psi$ y el cálculo de la pendiente de la regresión lineal (A) se hizo con el software Origin (Microcal, Northampton, EE.UU.). La tensión residual se calculó con la siguiente fórmula: $\sigma = EC \times (1/d_0) \times A$; donde d_0 es la distancia interplanar para $\psi = 0^\circ$ (316,317).

Ensayos de corrosión

Se intentó llevar a cabo los ensayos de corrosión embebiendo las partículas metálicas en una resina polimérica; sin embargo, hubo vacíos de conducción que impidieron un correcto análisis de la resistencia a la corrosión de la muestra. Para solventar este problema se prepararon diez discos de Ti6Al4V trabajados en frío al 12.75 % (grupo experimental) para conseguir las mismas propiedades mecánicas (dureza, resistencia, módulo de Young, deformación y tensión residual) que las partículas de implantoplastia (Figura 27). Esta preparación tuvo como objetivo aumentar la fiabilidad de los ensayos de corrosión. Por otro lado, se utilizaron como grupo control diez discos de Ti6Al4V sin implantoplastia.

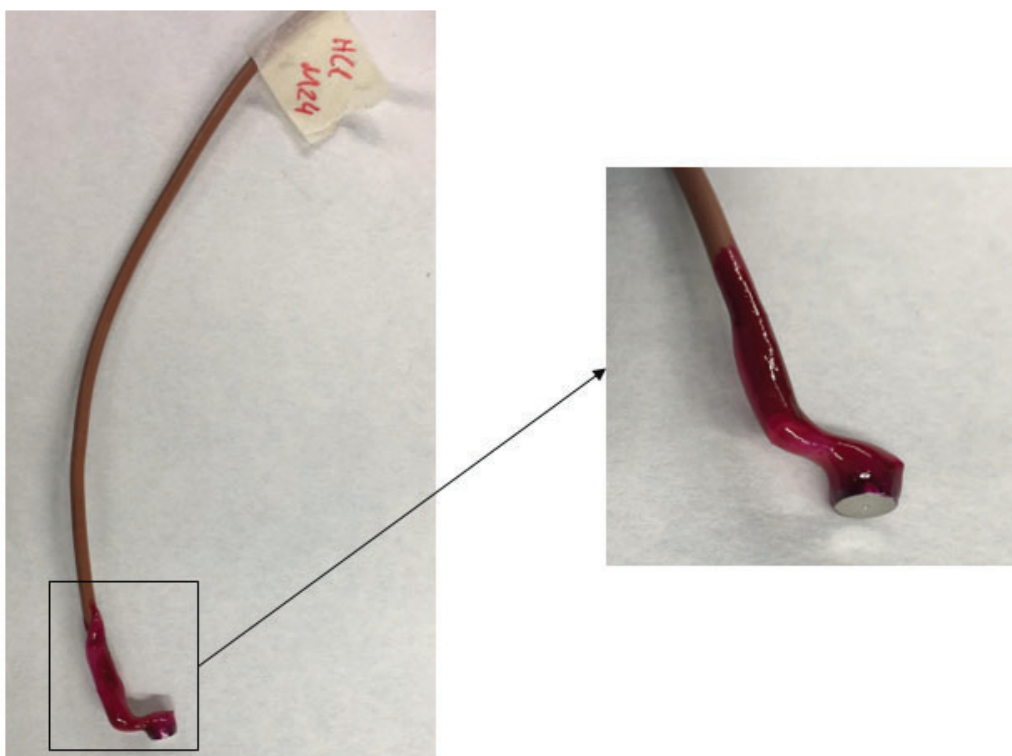


Figura 27. Muestras preparadas para los ensayos de corrosión.

Todos los discos se pulieron metalográficamente siguiendo las recomendaciones definidas en la norma ASTM E3-17 (318). Los discos se pulieron con láminas de esmerilado de carburo de silicio y con pasta de suspensión de diamante con un tamaño de grano medio de $5\text{ }\mu\text{m}$ a $0.1\text{ }\mu\text{m}$ (Buehler S4. EE.UU.). Todas las muestras con forma de disco metálico se alisaron hasta alcanzar una rugosidad superficial (R_a) inferior a 20 nm . Una vez finalizada la fase de pulido, las muestras se limpiaron con un protocolo de baño de inmersión secuencial utilizando ciclohexano, isopropanol, etanol, agua desionizada, acetona y etanol durante 15 minutos por cada baño de limpieza junto con la sonicación (todos los productos químicos de Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Los grupos de muestras se mantuvieron individualmente sumergidos en un volumen constante de electrolito durante todas las mediciones. Se seleccionó la solución de Hank como electrolito para simular las condiciones fisiológicas orales reales (la

composición se muestra en la Tabla 9). El electrolito se mantuvo bajo un pH constante (6.7) durante los experimentos y se renovó completamente para cada experimento (313,319,320).

Tabla 9. Composición química de la solución de Hank

Composición química	NaCl	KCl	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄	NaHCO ₃	C ₆ H ₁₂ O ₆
Concentración [mM]	137	5.4	0.25	0.44	1.3	1.0	4.2	5.5

Las pruebas se efectuaron con un potenciostato PARSTAT 2273 (Princeton, San José, EE.UU.) controlado por el software Voltamaster 4 (Radiometer Analytical, Villeurbanne Cedex, Francia) (Figura 28). Tanto para los ensayos de medida de potencial de circuito abierto como para los ensayos potenciodinámicos el electrodo de referencia que se utilizó fue un electrodo de calomelanos (KCl saturado), con un potencial de 0.241 V frente al electrodo estándar de hidrógeno.



Figura 28. Potenciostato PARSTAT 2273.

Todos los ensayos se hicieron a temperatura ambiente y en una jaula de Faraday para evitar la interacción de campos eléctricos externos. En la Figura 29 se representa el montaje experimental del ensayo de corrosión

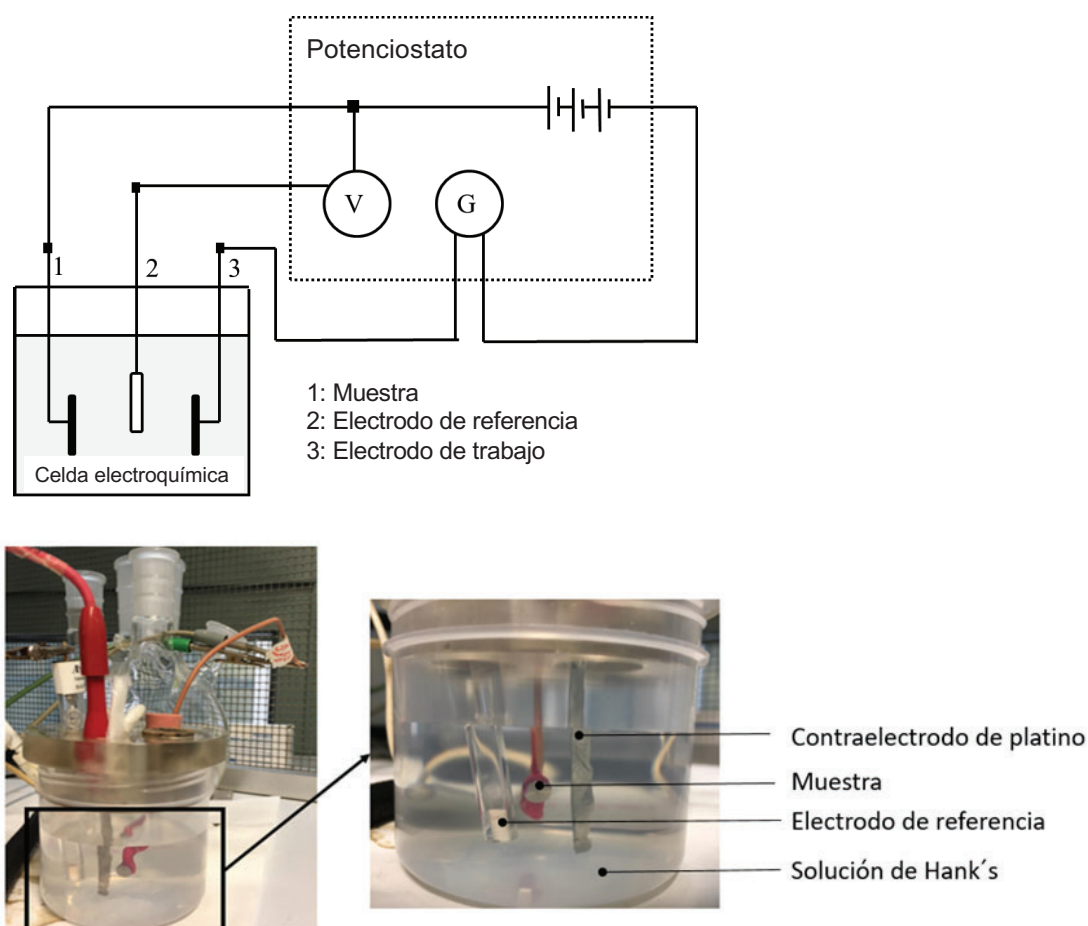


Figura 29. Esquema del montaje del circuito eléctrico de tres electrodos y el equipo utilizado en los ensayos electroquímicos.

Potencial en circuito abierto

Los ensayos se hicieron durante 5 horas para todas las muestras, tomando medidas cada 10 segundos. Se consideró que el potencial estaba estabilizado cuando la variación del potencial era inferior a 2 mV en un periodo de 30 minutos, tal y como indican las normas ASTM G5 e ISO 10993-5:2009 (313,319). Esta prueba determina la susceptibilidad a la corrosión (potencial más bajo). Los datos y las curvas E-t se obtuvieron utilizando el programa PowerSuite con la función PowerCorr-Open circuit.

Ensayos potenciodinámicos

Se han obtenido curvas cíclicas de polarización potenciodinámicas de los dos grupos de estudio siguiendo la norma ASTM G5. En este ensayo se aplicó un potencial eléctrico variable gracias al potenciostato entre la muestra y el electrodo de referencia provocando el paso de una corriente entre la muestra y el contraelectrodo. El contraelectrodo empleado fue de Platino.

Se estabilizó el sistema mediante una prueba en circuito abierto de 5 horas. Tras esta estabilización se hizo el ensayo potenciodinámico mediante un barrido cíclico desde -0.8 mV hasta 1.7 mV con una velocidad de 2 mV/s. Estos parámetros se analizaron en el programa PowerSuite con la función PowerCorr-Cyclic Polarization para la obtención de las curvas.

Los parámetros obtenidos fueron la intensidad de corrosión (i_{CORR} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)) y el potencial de corrosión (E_{CORR} (mV)) (valor a partir del cual la densidad de corriente cambia de catódico a anódico). Los parámetros E_{CORR} e i_{CORR} se obtuvieron por extrapolación de las pendientes de Tafel (320–325) (Figura 30).

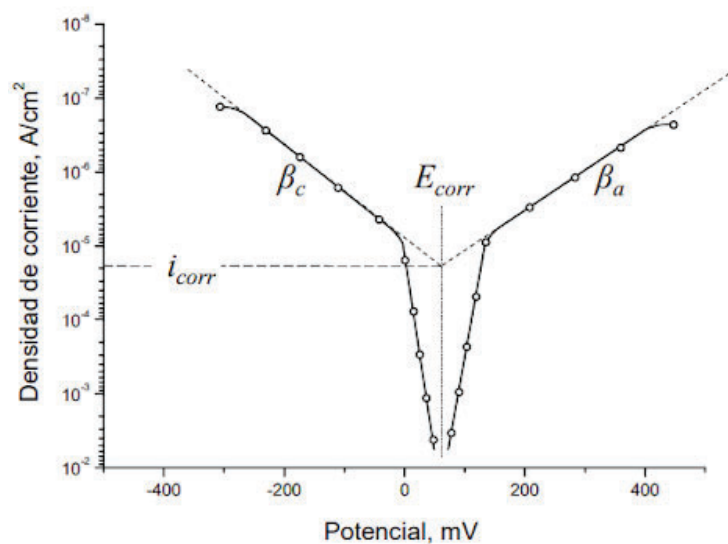


Figura 30. Representación esquemática de la extrapolación de las pendientes de Tafel.

De acuerdo con la norma ASTM G102-89 la obtención de estos valores nos permite calcular la resistencia de polarización (R_p) mediante la expresión de Stern-Geary y la velocidad de corrosión (CR en mm/año). Ver las siguientes ecuaciones de la R_p y la CR:

$$R_p = \frac{\beta_a \beta_c}{2.303(\beta_a + \beta_c) i_{corr}}$$

$$CR = K_1 \frac{i_{corr}}{\rho} EW$$

$K_1 = 3.27 \cdot 10^{-3} \text{ mm} \cdot \text{g} / \mu\text{A} \cdot \text{cm} \cdot \text{yr}$, es la densidad del Ti (4.54 g/cm^3) y EW su peso equivalente (11.98, se considera adimensional en estos cálculos).

Análisis estadístico

Se utilizó un software estadístico (MinitabTM 13.1, Minitab Inc., State College, EE.UU.) para calcular las diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba ANOVA y el test de Fisher para comparaciones múltiples. El nivel de significación se estableció en un valor $p < 0.05$.

Resultados

Microscopía electrónica de barrido y propiedades mecánicas

Como se describió en la Parte I, las partículas metálicas obtenidas por implantoplastia tenían una geometría aplanada tipo escamas, con claros signos de altos niveles de deformación plástica producto del pulido (Figura 31a). La microestructura observada por la SEM de las partículas metálicas mostraba bandas de deslizamiento que revelaban las microestructuras en placa tipo Widmanstätten de la aleación Ti6Al4V, lo que indica que la aleación absorbió una gran deformación antes de la fractura. La Figura 31b muestra la microestructura Widmanstätten con una estructura laminar muy

finas. Las láminas estaban formadas por placas de fase alfa (fase blanca) rodeadas de fase beta (fase oscura) (326–328).

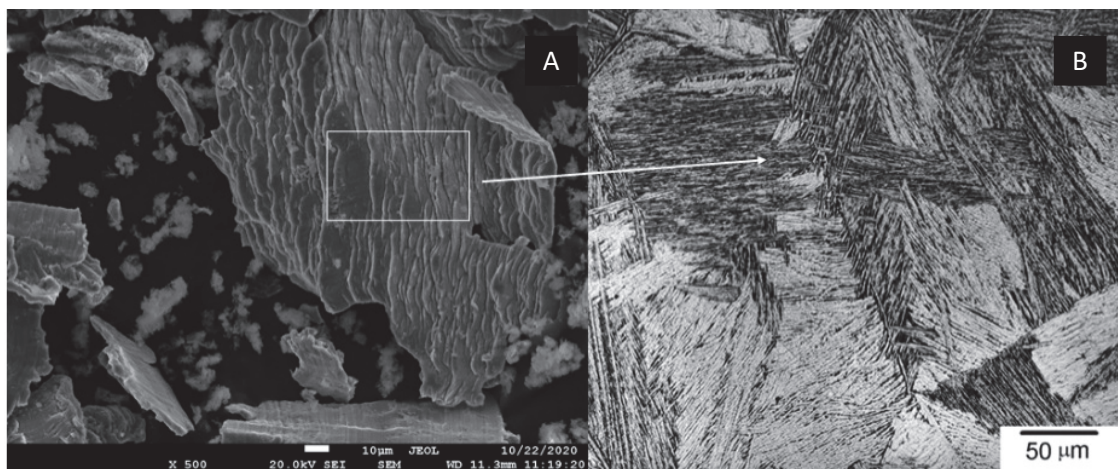


Figura 31. Imágenes de microscopía electrónica de barrido; A) Partículas de implantoplastia a una magnificación de x500, B) Microestructura de Widmanstätten de las partículas de la implantoplastia.

Se llevaron a cabo 100 indentaciones (10 x 10) a diferentes cargas (1, 2, 3 y 4 mN). Los valores de dureza y módulo elástico se mantuvieron constantes para todo el rango de cargas aplicadas, tal como se aprecia en la Tabla 10. Los ensayos posteriores (mapas de dureza y de módulo de elasticidad) se hicieron con una carga constante de 2 mN. Con esta carga el defecto de punta (redondeo debido al proceso de fabricación) y el efecto de la rugosidad inducida por el pulido es menospreciable. Por lo tanto, se escogió la carga mínima que permitió correlacionar las propiedades mecánicas con la microestructura. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores medios de dureza y módulo elástico.

Tabla 10. Resultados del ensayo de nanoindentación realizado sobre los implantes dentales. Los resultados están expresados con medias (desviación típica).

Carga en mN	Profundidad media de la indentación (DT), [mm]	Dureza media (DT), [GPa]	Módulo elástico medio (DT), [GPa]
1	89 (3)	2.89 (0.39)	70 (5)
2	135 (5)	2.28 (0.44)	66 (4)
3	168 (5)	2.56 (0.33)	65 (3)
4	197 (5)	2.53 (0.33)	65 (3)

La Figura 32 representa los mapas de distribución de la dureza y el módulo elástico medidos en la zona interior y zona superficial roscada del implante dental. El análisis comparativo de los resultados mostró un aumento conjunto de la dureza y el módulo elástico del material base (Ti6Al4V) en la zona roscada, como consecuencia de la deformación plástica generada durante los procesos de fabricación del mecanizado.

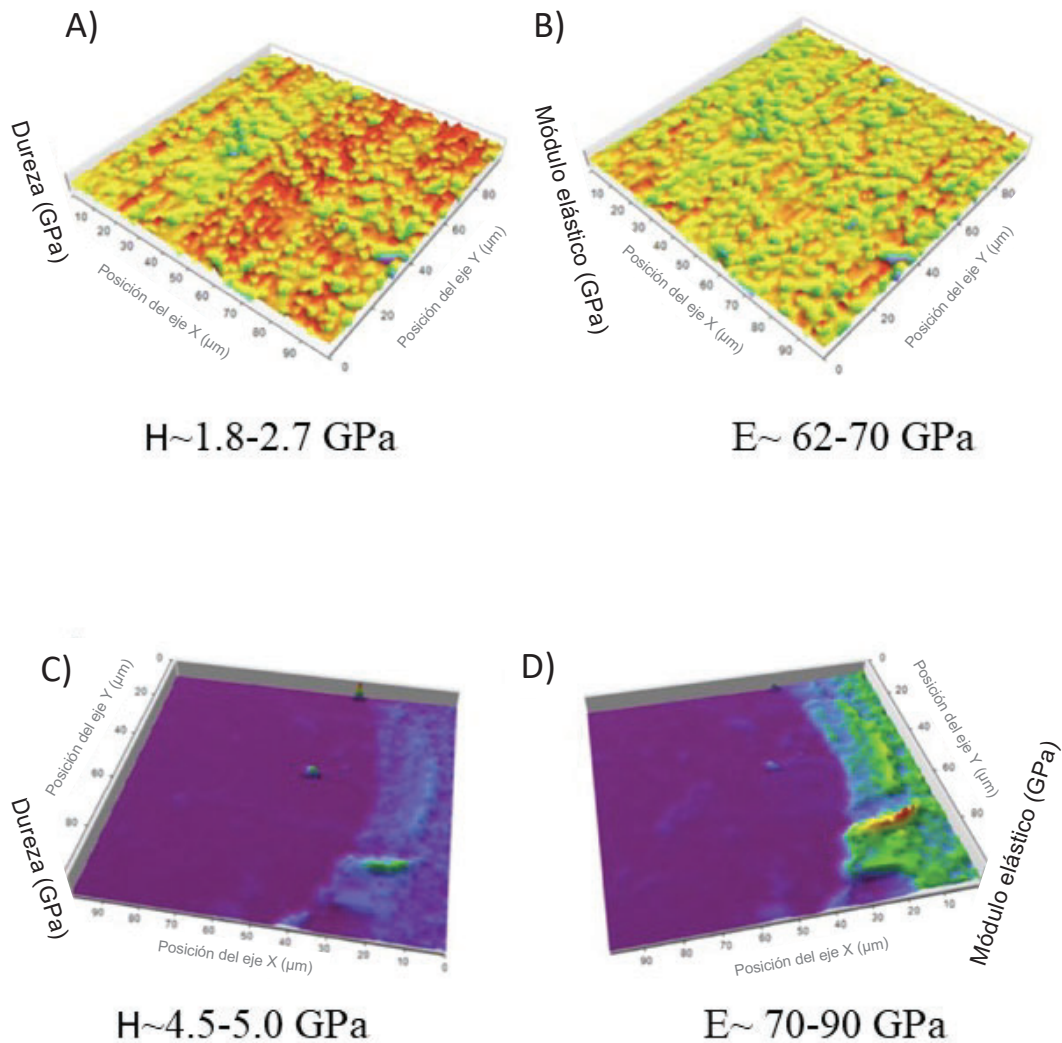


Figura 32. Mapa de la distribución de la dureza de la zona interior del implante control (A); Mapa del módulo elástico de la zona interior del tornillo (B); Mapa de la dureza de la zona superficial del tornillo (C); Mapa del módulo elástico de la superficie del tornillo (D).

En la Figura 33 se muestran las curvas de dureza y módulo elástico en función de la profundidad de indentación en las partículas metálicas.

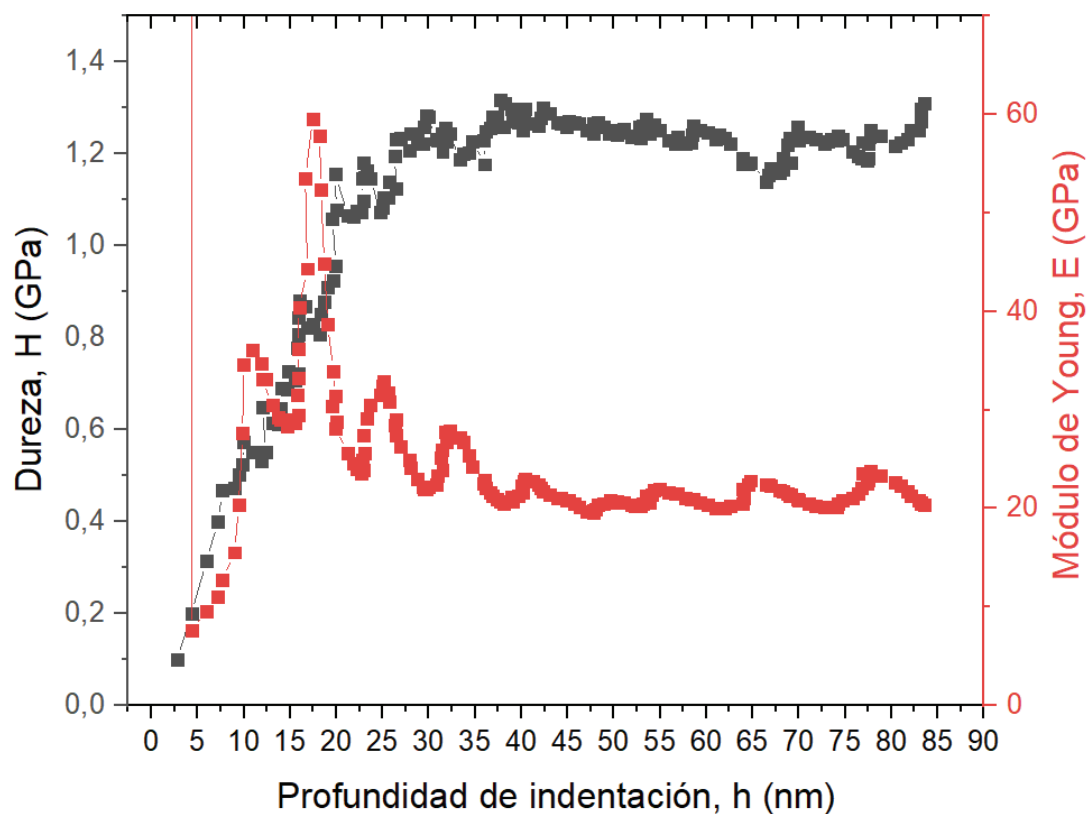


Figura 33. Curvas de dureza y módulo elástico en función de la profundidad de indentación medidas sobre las partículas de la implantoplastia

La implantoplastia aumentó la dureza y el módulo elástico de las partículas metálicas. Este hecho se explica porque el fresado aumentó la densidad de dislocaciones y defectos en la estructura metálica hasta la fractura del implante en forma de partículas. Como era de esperar, la estimación de la deformación máxima disminuyó, al igual que la tenacidad del metal. Las tensiones residuales fueron negativas en todos los casos, lo que indica un estado de compresión (329,330). Así pues, el procedimiento de implantoplastia aumentó notablemente las tensiones residuales.

Además, el trabajo en frío del 12.5 % de Ti6Al4V dio lugar a propiedades mecánicas muy similares a las de la implantoplastia (Tabla 11). Por lo tanto, los discos trabajados en frío simularon las partículas metálicas de la implantoplastia en los estudios de corrosión. En todos los parámetros mecánicos, las diferencias entre los discos de

control y las partículas de implantoplastia o los discos trabajados en frío fueron significativas ($p < 0.05$).

Tabla 11. Propiedades mecánicas obtenidas por nanoindentación, y estrés residual determinado mediante difracción de rayos X. Los resultados están expresados con medias (desviación típica).

Muestras	Dureza media (DT), [GPa]	Módulo elástico medio (DT), [GPa]	Deformación máxima (DT), [%]	Estrés residual (DT), [MPa]
Discos control	2.2 (1.2)	65 (5)	12.0 (4.2)	-27.5 (5.2)
Implantoplastia	4.8 (1.0)	80 (9)	4.3 (0.7)	-354.5 (35.2)
Discos de Ti trabajados en frío	4.7 (0.9)	78 (8)	4.0 (0.5)	-345 (3.2)

Ensayos de corrosión

El potencial de corrosión abierto (E_{OCP}) se determina cuando el sistema de corrosión alcanza un estado estacionario, en el que las velocidades de reacción catódica y anódica están correctamente equilibradas sin que haya un flujo de corriente neto hacia o desde el electrodo. El valor E_{OCP} se utiliza para indicar cualitativamente el comportamiento de la corrosión de un material. Se puede clasificar como activo o pasivo según su signo (331,332).

En la Figura 34 se muestran los resultados del E_{OCP} . El E_{OCP} para el control de Ti fue de media -204 ± 18 mV y para las muestras de implantoplastia de -254 ± 3 mV ($p < 0.05$), lo que significa que el control fue más electropositivo y en consecuencia más resistente a la corrosión.

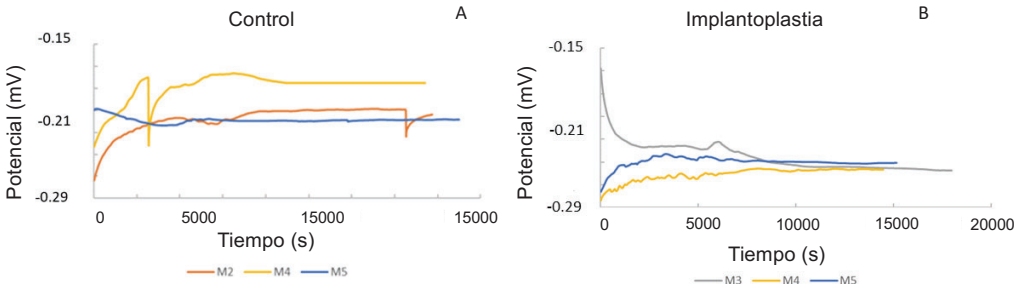


Figura 34. Curvas del potencial de circuito abierto para el disco control (material de implante dental original) (A), y las muestras de implantoplastia (B).

Las curvas potenciodinámicas de los dos grupos se pueden observar en la Figura 35. Para todos los parámetros calculados, el grupo control presentó una mayor resistencia a la corrosión que el grupo de implantoplastia, ya que sus valores de E_{CORR} , I_{CORR} y tasa de corrosión son menores, mientras que la resistencia a la polarización fue mayor (Tabla 12). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros mencionados ($0.15 > p > 0.05$).

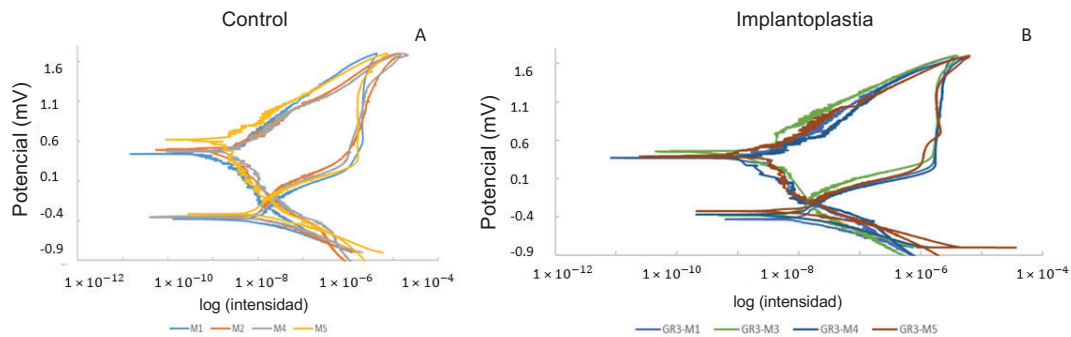


Figura 35. Curvas potenciodinámicas para el disco control (material original del implante dental) (A), y las muestras de implantoplastia (B).

Tabla 12. Parámetros electroquímicos obtenidos mediante las curvas potenciodinámicas para las muestras control y de implantoplastia. Los resultados se expresan con medias (desviación típica).

Muestras	E_{corr} (DT), [mV]	I_{corr} (DT), [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	Resistencia a la polarización (DT), [Ω/cm^2]	Tasa de corrosión (DT), [mm/año]
Discos control	-340 (32)	0.051 (0.007)	1.14×10^6 (1.13×10^5)	4.44×10^{-4} (6.69×10^{-5})
Implantoplastia	-368 (47)	0.055 (0.005)	1.07×10^6 (1.77×10^5)	4.77×10^{-4} (4.46×10^{-5})

En la Figura 36 se muestran imágenes del SEM de las superficies de las muestras de control y de implantoplastia después de las pruebas de corrosión. Se seleccionaron las zonas con fallos de mecanizado, ya que son las más susceptibles a la corrosión. La muestra de implantoplastia mostró muchas picaduras, mientras que la muestra de control no mostró ninguna (333).

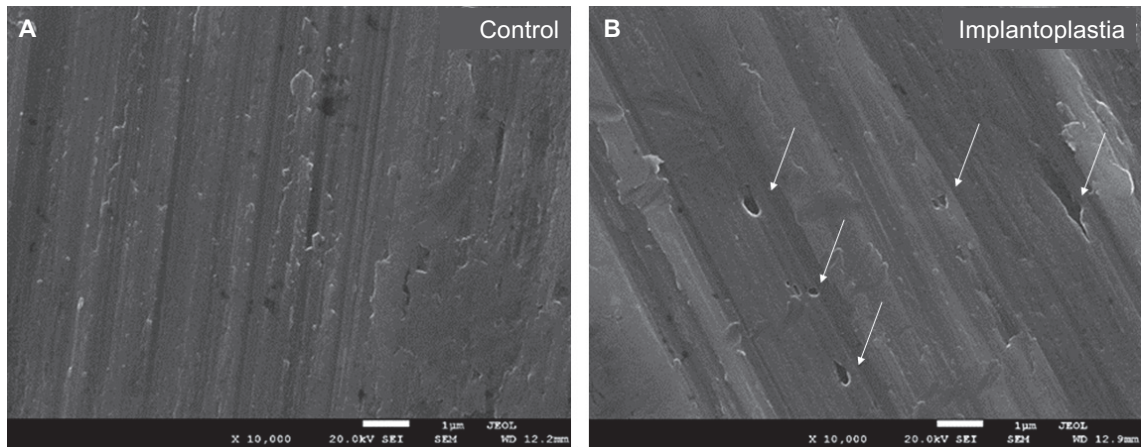


Figura 36. Imágenes SEM de la superficie de los discos control (sin modificación de su superficie) (A) y de los discos de la implantoplastia (B). Las flechas señalan picaduras en la superficie de los discos que simulan la superficie de las partículas de la implantoplastia.

Artículo original

Article

Mechanical Properties and Corrosion Behavior of Ti6Al4V Particles Obtained by Implantoplasty: An In Vitro Study. Part II

Jorge Toledano-Serrabona ¹, Maria Ángeles Sánchez-Garcés ^{1,*} , Cosme Gay-Escoda ¹,
Eduard Valmaseda-Castellón ¹, Octavi Camps-Font ¹ , Pablo Verdeguez ², Meritxell Molmeneu ³ 
and Francisco Javier Gil ^{2,4,*} 

¹ Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Department of Oral Surgery and Implantology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, 08907 Barcelona, Spain; jorgetoledano25@gmail.com (J.T.-S.); cgay@ub.edu (C.G.-E.); eduardvalmaseda@ub.edu (E.V.-C.); ocamps@ub.edu (O.C.-F.)

² Bioengineering Institute of Technology, International University of Catalonia, 08195 Barcelona, Spain; pverdeguez@gmail.com

³ Biomaterials, Biomechanics and Tissue Engineering Group (BBT), Department of Materials Science and Engineering, Polytechnic University of Catalonia, 08019 Barcelona, Spain; meritxell.molmeneu@upc.edu

⁴ Faculty of Dentistry, International University of Catalonia, 08195 Barcelona, Spain

* Correspondence: masanchezg@ub.edu (M.Á.S.-G.); xavier.gil@uic.es (F.J.G.)



Citation: Toledano-Serrabona, J.; Sánchez-Garcés, M.Á.; Gay-Escoda, C.; Valmaseda-Castellón, E.; Camps-Font, O.; Verdeguez, P.; Molmeneu, M.; Gil, F.J. Mechanical Properties and Corrosion Behavior of Ti6Al4V Particles Obtained by Implantoplasty: An In Vitro Study. Part II. *Materials* **2021**, *14*, 6519. <https://doi.org/10.3390/ma14216519>

Academic Editor: Alessandro Vichi

Received: 13 September 2021

Accepted: 25 October 2021

Published: 29 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In the field of implant dentistry there are several mechanisms by which metal particles can be released into the peri-implant tissues, such as implant insertion, corrosion, wear, or surface decontamination techniques. The aim of this study was to evaluate the corrosion behavior of Ti6Al4V particles released during implantoplasty of dental implants treated due to periimplantitis. A standardized protocol was used to obtain metal particles produced during polishing the surface of Ti6Al4V dental implants. Physicochemical and biological characterization of the particles were described in Part I, while the mechanical properties and corrosion behavior have been studied in this study. Mechanical properties were determined by means of nanoindentation and X-ray diffraction. Corrosion resistance was evaluated by electrochemical testing in an artificial saliva medium. Corrosion parameters such as critical current density (i_{cr}), corrosion potential (E_{CORR}), and passive current density (i_{CORR}) have been determined. The samples for electrochemical behavior were discs of Ti6Al4V as-received and discs with the same mechanical properties and internal stresses than the particles from implantoplasty. The discs were cold-worked at 12.5% in order to achieve the same properties (hardness, strength, plastic strain, and residual stresses). The implantoplasty particles showed a higher hardness, strength, elastic modulus, and lower strain to fracture and a compressive residual stress. Resistance to corrosion of the implantoplasty particles decreased, and surface pitting was observed. This fact is due to the increase of the residual stress on the surfaces which favor the electrochemical reactions. The values of corrosion potential can be achieved in normal conditions and produce corroded debris which could be cytotoxic and cause tattooing in the soft tissues.

Keywords: implantoplasty; corrosion; Ti6Al4V; dental implant

1. Introduction

Commercially pure titanium (cp-Ti) dental implants are an excellent long-term treatment for patients with loss of teeth [1,2]. Titanium dental implants (grades I–IV) are highly reliable due to their excellent biocompatibility, mechanical characteristics, and good corrosion resistance among other properties [3–5]. However, the strongest grade of cp-Ti has a strength of around 550 MPa. Thus, other Ti alloys have been designed in order to increase the strength of the material [6]. Among Ti alloys, Ti6Al4V is an (α - β)-type that has been used in a wide range of biomedical purposes. This alloy was first developed in

the aerospace industry but due to its strength, excellent corrosion resistance, and biocompatibility, Ti6Al4V is used for biomedical purposes. There are some concerns related to the long-term use of Ti6Al4V that have already been outlined in Part I. In summary, as Ti6Al4V contains toxic V, different alloys such as Ti6Al7Nb, Ti5Al2.5Fe, or TiZr have been proposed to replace it. However, Ti6Al4V remains the most widely used Ti alloy for dental implants [6–11].

During the lifespan of dental implants, different complications may occur, such as mechanical, biological, and esthetic complications. Biological complications comprise peri-implant mucositis and peri-implantitis, both of which are inflammatory conditions induced by bacterial plaque affecting the surrounding tissues of the dental implant [12]. Nonsurgical treatment is sufficient for remission of peri-implant mucositis, but not for peri-implantitis. Depending on the type of peri-implant defect and the location of the implant, surgical treatment of peri-implantitis includes access surgery, resective surgery, peri-implant bone reconstruction (regenerative or reconstructive surgery), or a combination of these techniques [13]. Additionally, it is crucial to decontaminate the dental implant surface during nonsurgical or surgical procedures to stop the progression of the disease [14].

Metal particles of different sizes are generated during the insertion of the dental implant, bed preparation, machining to improve the fit of the prosthesis, or wear due to micro-movements or functional loading. Dental implant surface decontamination procedures to treat peri-implantitis can also generate metallic debris. These particles with high internal energy can have significant physiological effects, such as an increase of the corrosion rate with generation of debris, cytotoxicity, an increase of ion release, and loss of the mechanical properties (such as crack nucleation on the surface resulting in fatigue). These aspects might disrupt osseointegration and cause bone resorption (osteolysis), which in turn may lead to implant loss [15–19].

The oral medium, with the presence of saliva, bacteria, other metals and alloys, and chemical products (for instance, gastric acids caused by reflux) causes corrosion and chemical degradation of titanium or titanium alloys [20–24].

In addition to the negative impact on biology, the corrosion of dental alloys can also have a negative effect on function and aesthetics of a dental prosthesis. The process of corrosion generates corrosion debris, which contains toxic oxides and metal ions that may not only come into contact with the surrounding cells and tissues, but also be distributed throughout the body through the bloodstream, intestines, and urinary excretory system. Debris particles of 10 to 20 μm in size have been detected at the implant surface and peri-implant bone, and distant sites, such as the lungs, liver, and kidney [25].

The purpose of this investigation was to describe the mechanical characteristics, including hardness and elastic modulus, as well as to determine the corrosion behavior of metal particles originating from commonly used Ti6Al4V (grade 5) following an implantoplasty procedure. This aims to raise the awareness of potential detrimental effects of implantoplasty and the need for careful consideration of the dental implant material.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Preparation

A single investigator (J.T-S.) carried out implantoplasty procedures of Ti6Al4V dental implants following the drilling protocol described in previous publications [26,27]. A GENTLEsilence LUX 8000B turbine was used (KaVo Dental GmbH, Biberach, Germany) with water irrigation at room temperature. The surface was sequentially modified with a fine-grained tungsten carbide bur and two polishers, as described in Part I. The sample was lyophilized to rid the water from the metal particles.

2.2. Scanning Electron Microscopy and Mechanical Properties

As previously described in Part I, the morphometry of the sample was determined by scanning electron microscopy Neon 40 Surface Scanning Electron Focused Ion Beam Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Germany).

A hardness analysis was performed using nanoindentation techniques on the dental implant (base material) and on the metal debris released during implantoplasty in order to determine the hardness and elastic modulus of both types of samples.

The nanoindentation assays were carried out using “Berkovich” type indenters, with a constant strain rate of 0.05 s^{-1} . An iMiro (KLA tencor, Kavo dental, Bibereach, Germany) and a Nanoindenter XP (MTS Systems Corporation, Oak Ridge, TN, USA) were used for the determination of implant hardness and metal debris hardness, respectively.

Residual stresses were measured with a diffractometer incorporating a Bragg–Brentano configuration (D500, Siemens, Wurzburg, Germany). Following Bragg’s law, the superficial stress can be calculated since X-Ray diffraction allows the determination of the interplanar distance before and after shot blasting. After the treatment, the interplanar distance is smaller due to the residual compressive stress. The differences in the interatomic distance allow calculation of the microstrain, which, together with the elastic modulus of the material, allows the determination of the residual stress on the surface. The measurements were done for the family of planes (213) which diffracts at $2\theta = 139.5^\circ$. The elastic constants of Ti at the direction of this family of planes are $EC = (E/(1 + \nu)) (213) = 90.3 \text{ GPa}$ [1,4]. Eleven ψ angles, 0° , and five positive and five negative angles were evaluated. The position of the peaks was adjusted with a pseudo-Voigt function using appropriate software (WinplotR, free access online), and then converted to interplanar distances ($d\psi$) using Bragg’s equation. The $d\psi$ vs. $\sin^2\psi$ graphs and the calculation of the slope of the linear regression (A) were done with appropriate software (Origin, Microcal, Northampton, MA, USA). The residual stress is: $\sigma = EC \times (1/d_0) \times A$; where d_0 is the interplanar distance for $\psi = 0^\circ$ [28,29].

2.3. Corrosion Test

We prepared ten discs of as-received material (Ti6Al4V) used for machine dental implants (control group), and ten discs of Ti6Al4V cold-worked at 12.75% in order to achieve the same mechanical properties (hardness, strength, Young’s modulus, strain, and residual stress) as the implantoplasty particles (experimental group). This preparation was aimed at increasing the reliability of corrosion tests. The tests with the particles included in polymeric non-conductive resin showed high deviations due to the lack of continuity of the metallic particles.

All discs were polished metallographically following the recommendations defined in ASTM E3-17 Standard [30]. Discs were treated with sequential grinding steps with different SiC papers. Samples were finally polished using diamond suspension paste with an average particle grain size ranging from $5 \mu\text{m}$ to $0.1 \mu\text{m}$ (Buehler S4, Lake Bluff, IL, USA). All metallic disc-shaped samples were smoothed up to a surface roughness (Ra) under 20 nm. Upon completion of the polishing phase, samples were cleaned with a sequential immersion bath protocol using cyclohexane, isopropanol, ethanol, deionized water, acetone, and ethanol for 15 min for each cleaning bath, together with sonication (all chemicals from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Testing sample groups were kept individually immersed in a constant volume of electrolyte for all the measurements. Hank’s solution was selected as an electrolyte in order to simulate the real oral physiological conditions (composition displayed in Table 1). The electrolyte was kept under constant pH (6.7) during the experiments and was completely renewed for each experiment [31–33].

Table 1. Chemical composition of Hank’s solution.

Chemical Composition	NaCl	KCl	Na_2HPO_4	KH_2PO_4	CaCl_2	MgSO_4	NaHCO_3	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Concentration (mM)	137	5.4	0.25	0.44	1.3	1.0	4.2	5.5

The tests were carried out with a PARSTAT 2273 potentiostat (Princeton, San Jose, CA, USA) controlled by Voltamaster 4 software (Radiometer Analytical, Villeurbanne Cedex, France). For both open circuit potential measurement tests and potentiodynamic tests, the

reference electrode was a calomel electrode (saturated KCl), with a potential of 0.241 V versus the standard hydrogen electrode. The auxiliary electrode was a platinum electrode with a surface of 240 mm² (Radiometer Analytical, Villeurbanne, France). All the tests were carried out in a Faraday box to avoid the interaction of external electric fields. Figure 1 depicts the experimental setup of corrosion test.

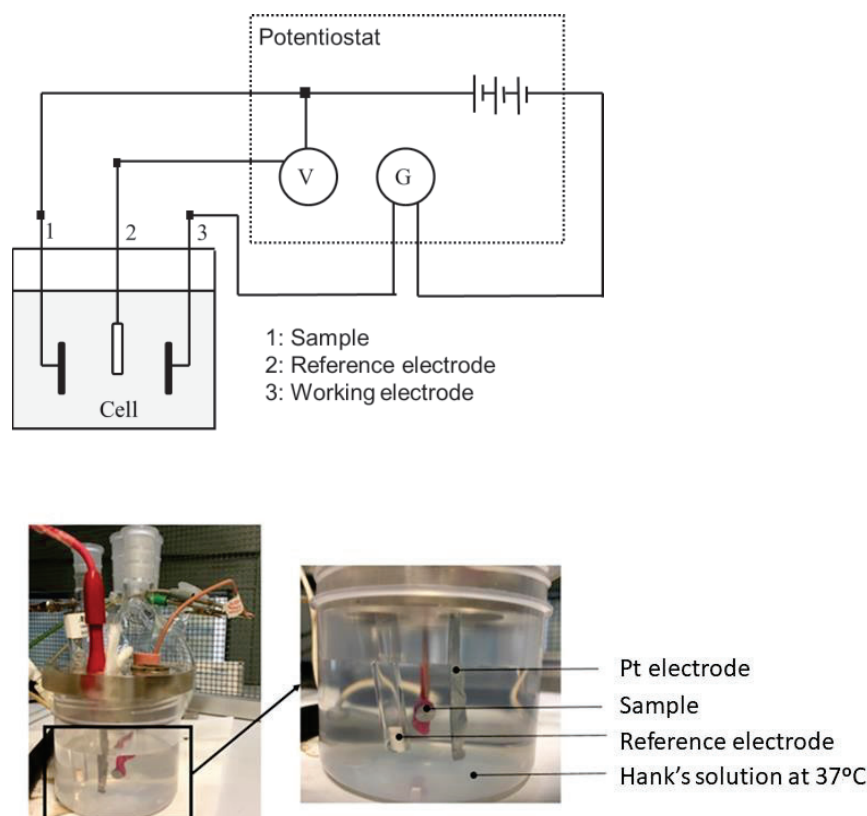


Figure 1. Three-electrode electrical circuit setup diagram and equipment used in electrochemical tests.

2.3.1. Open Circuit Potential

Tests were carried out for 5 h for all samples, taking measurements every 10 s. The potential was considered to be stabilized when the variation of the potential was less than 2 mV for a period of 30 min as indicated by the ASTM G5 and ISO 10993-5:2009 standards [31,32]. This test determines the susceptibility to corrosion (lower potential). The data and E–t curves were obtained using the PowerSuite program with the PowerCorr–Open circuit function.

2.3.2. Potentiodynamic Tests (E–log(^I) Curves)

Cyclic potentiodynamic polarization curves were obtained for the two study groups following the ASTM G5 standard. In this test, a potentiostat induced a variable electrical potential between the sample and the reference electrode, thus causing the passage of a current between the sample and a platinum counter electrode.

Before starting the test, the system was allowed to stabilize by means of a 5 h open-circuit test. After stabilization, a potentiodynamic test was made by means of a cyclic potential range from −0.8 mV to 1.7 mV at a rate of 2 mV/s. These parameters were

analyzed by the PowerSuite program, using the PowerCorr-Cyclic Polarization function to obtain the curves.

The parameters obtained were corrosion current density (i_{CORR} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)) and corrosion potential (E_{CORR} (mV)) (value at which the current density changes from cathodic to anodic). The E_{CORR} and I_{CORR} parameters were obtained by extrapolation of the Tafel slopes [34–39].

According to ASTM G102-89, obtaining these values allows calculation of the polarization resistance (R_p) by means of the Stern–Geary expression (Equation (1)) and the corrosion rate (C_R in mm/year) (Equation (2)).

$$R_p = \frac{\beta_a \beta_c}{2.303(\beta_a + \beta_c)t_{corr}} \quad (1)$$

$$CR = K_1 \frac{t_{corr}}{\rho} EW \quad (2)$$

where $K_1 = 3.27 \times 10^{-3}$ mm-g/ $\mu\text{A}\cdot\text{cm}\cdot\text{year}$, the density of Titanium is $4.54 \text{ g}/\text{cm}^3$, EW is its equivalent weight (11.98, it is considered dimensionless in these calculations), β_a is the slope of the anodic curve, and β_c the cathodic one. The polarization resistance indicates the resistance of the sample to corrosion when subjected to small variations in potential.

2.4. Statistical Analysis

Statistically significant differences were studied using statistical software (MinitabTM 13.1, Minitab Inc., State College, PA, USA). ANOVA tables with multiple comparison Fisher tests were calculated. The level of significance was established at p -value < 0.05 .

3. Results

3.1. Scanning Electron Microscopy and Mechanical Properties

As described in Part I, the metal particles obtained by implantoplasty had a flattened geometry similar to “flakes” with clear signs of high levels of plastic deformation resulting from chipping (Figure 2a). The microstructure observed by SEM of the particles showed slip bands revealing the Widmanstatten plate microstructures of the Ti6Al4V alloy, which indicates that the Ti6Al4V absorbed a large deformation before the fracture. Figure 2b shows the Widmanstatten microstructure with very thin lamellar structure. The plates consisted of alpha phase plates (white phase) surrounded by beta phase plates (dark phase) [40–42].

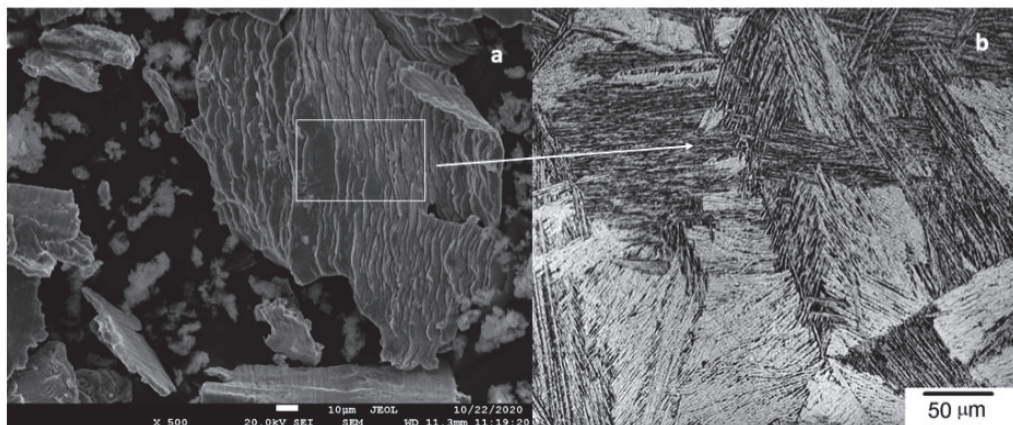


Figure 2. Scanning electron microscopy images: (a) implantoplasty particles at $\times 500$ magnification; (b) microstructure of Widmanstatten of the particles.

Arrays of 100 indentations (10×10) at different loads (1, 2, 3, and 4 mN) were carried out. The hardness and elastic modulus were constant for the entire range of applied loads, as shown in Table 2. The subsequent tests (hardness and modulus of elasticity maps) were carried out at a constant load of 2 mN. At this load, the tip defect (rounding due to the manufacturing process) and the effect of polishing-induced roughness are negligible. Thus, the minimum load that allowed a correlation of mechanical properties and microstructure was selected. No statistically significant differences are obtained in the hardness and elastic modulus.

Table 2. Results of the nanoindentation test performed on dental implants.

Load, (mN)	Mean Indentation Depth (SD), (mm)	Mean Hardness (SD), (GPa)	Mean Elastic Modulus (SD), (GPa)
1	89 (3)	2.89 (0.39)	70 (5)
2	135 (5)	2.28 (0.44)	66 (4)
3	168 (5)	2.56 (0.33)	65 (3)
4	197 (5)	2.53 (0.33)	65 (3)

Abbreviations: SD = Standard deviation.

Figure 3 depicts the hardness and elastic modulus distribution maps measured on the inner and threaded surface areas of the dental implant. The comparative analysis of the results showed a joint increase in the hardness and elastic modulus of the base material (Ti6Al4V) in the threaded area as a consequence of the plastic deformation generated during the machine manufacturing processes.

The hardness and elastic modulus curves as a function of penetration depth determined for the metal debris is depicted in Figure 4.

Implantoplasty increased the hardness and elastic modulus of the metallic particles. This fact is explained because milling increased the density of dislocations and defects in the metallic structure until the implant fractured in the form of particles. As expected, the estimation of the maximum deformation decreased, as did the toughness of the metal. Residual stresses were negative in all cases, which indicates a state of compression [43,44]. Thus, the implantoplasty procedure markedly increased residual stresses.

Additionally, cold-working of 12.5% Ti6Al4V resulted in mechanical properties which are very similar to those of implantoplasty (Table 3). Thus, cold-worked disks simulate implantoplasty particles in corrosion studies. In all mechanical parameters the differences between control disks and either implantoplasty particles or cold-worked disks were significant ($p < 0.05$).

3.2. Corrosion Behavior

Open corrosion potential (E_{OCP}) is determined when a steady state is reached by the corrosion system, in which both cathodic and anodic reaction rates are properly balanced with no net current flow to or from the electrode. E_{OCP} value is used to qualitatively indicate the corrosion behavior of a material. It can be categorized as active or passive according to its sign [3,25].

Table 3. Mechanical properties obtained by nanoindentation and residual stresses determined by X-ray diffraction. The results are expressed as mean and standard deviation.

Samples	Mean Hardness (SD), (GPa)	Mean Elastic Modulus (SD), (GPa)	Max Deformation (SD), (%)	Residual Stress (SD), (MPa)
Control disks	2.2 (1.2)	65 (5)	12.0 (4.2)	−27.5 (5.2)
Implantoplasty	4.8 (1.0)	80 (9)	4.3 (0.7)	−354.5 (35.2)
Ti cold-worked disks	4.7 (0.9)	78 (8)	4.0 (0.5)	−345 (3.2)

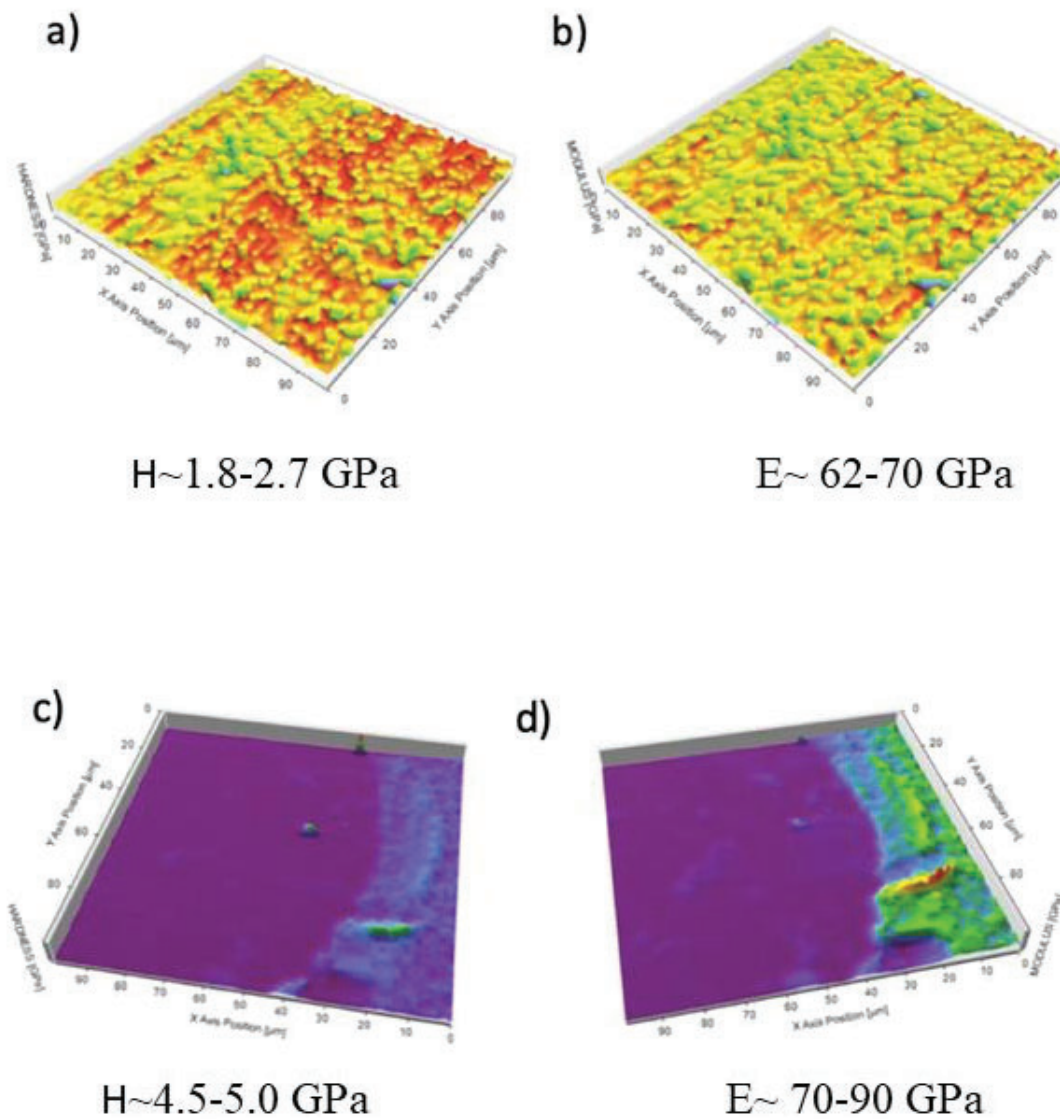


Figure 3. (a) Map of hardness distribution of the inner zone of the screw; (b) map of elastic modulus of the inner zone of the screw; (c) map of hardness of the surface zone of the screw; (d) map of elastic modulus of the surface of the screw. Figure 3 shows the hardness and elastic modulus curves as a function of penetration depth determined for the metal debris. Particles were harder than the base material. On the other hand, the elastic modulus of the metal debris showed values similar to those of the implant thread area.

The open circuit potential (E_{OCP}) results are shown in Figure 5. The potential was on average $-204 \pm 18 \text{ mV}$ for the titanium control, and $-254 \pm 3 \text{ mV}$ ($p < 0.05$) for the implantoplasty samples, which means that the titanium control was more electropositive and in consequence more resistant to corrosion.

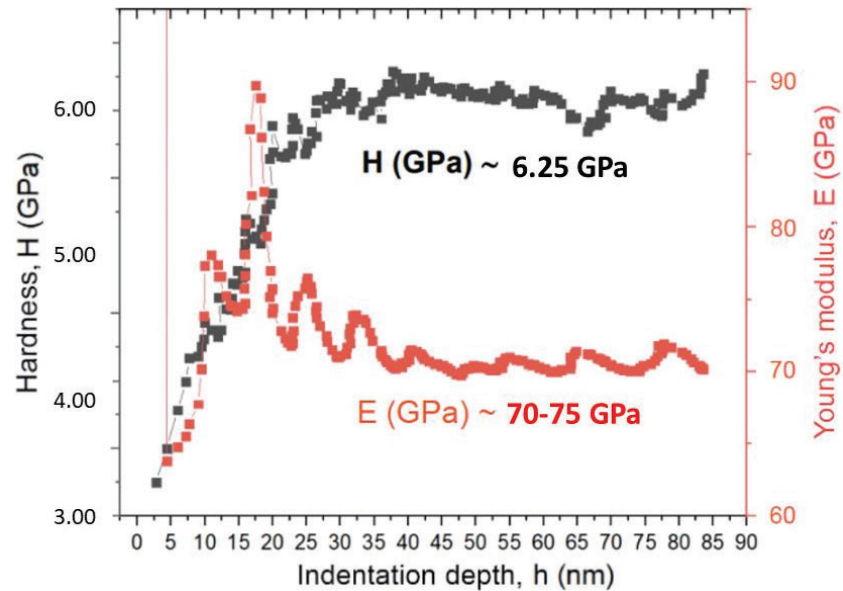


Figure 4. Hardness and elastic modulus curves according to indentation depth of the particles of the metal debris.

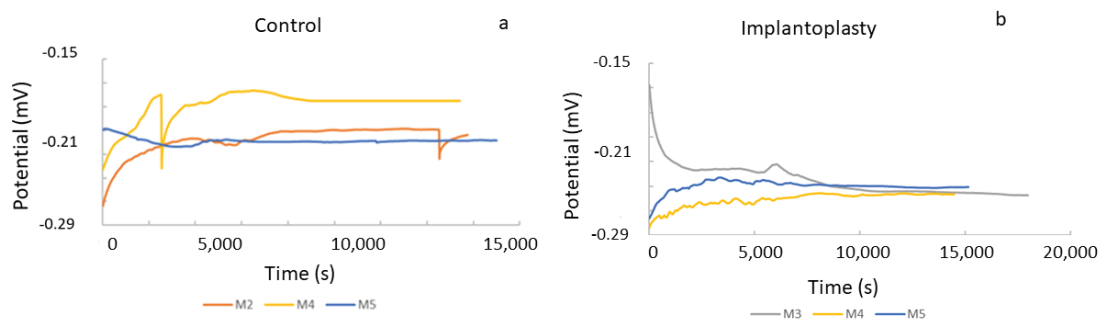


Figure 5. Curves of the open circuit potential for (a) control disc (original dental implant material) and (b) implantoplasty samples.

The potentiodynamic curves of the two groups can be observed in Figure 6. For all the calculated parameters, the control group presents better corrosion resistance than the implantoplasty group, since its E_{CORR} , I_{CORR} , and corrosion rate values are lower, and the polarization resistance is higher (Table 4). However, these differences were not statistically significant for any of the mentioned parameters ($0.15 > p > 0.05$).

Table 4. Electrochemical parameters obtained by the potentiodynamic curves for control and implantoplasty samples. The results are expressed as mean \pm standard deviation.

Samples	E_{corr} (SD), (mV)	I_{corr} (SD), ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	Polarization Resistance (SD), (Ω/cm^2)	Corrosion Rate (SD), (mm/Year)
Control disks	−340 (32)	0.051 (0.007)	1.14×10^6 (1.13×10^5)	4.44×10^{-4} (6.69×10^{-5})
Implantoplasty	−368 (47)	0.055 (0.005)	1.07×10^6 (1.77×10^5)	4.77×10^{-4} (4.46×10^{-5})

Figure 7 depicts SEM images of the surfaces of the control and implantoplasty samples after the corrosion tests. We selected areas with machining failures, as they are the most susceptible to corrosion. The implantoplasty sample showed much pitting, while the control sample did not display any [45].

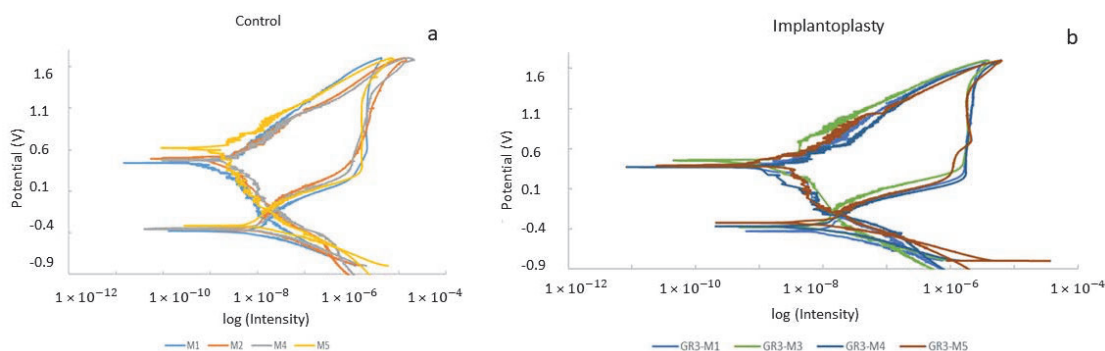


Figure 6. Potentiodynamic curves for (a) control disc (original dental implant material) and (b) implantoplasty samples.

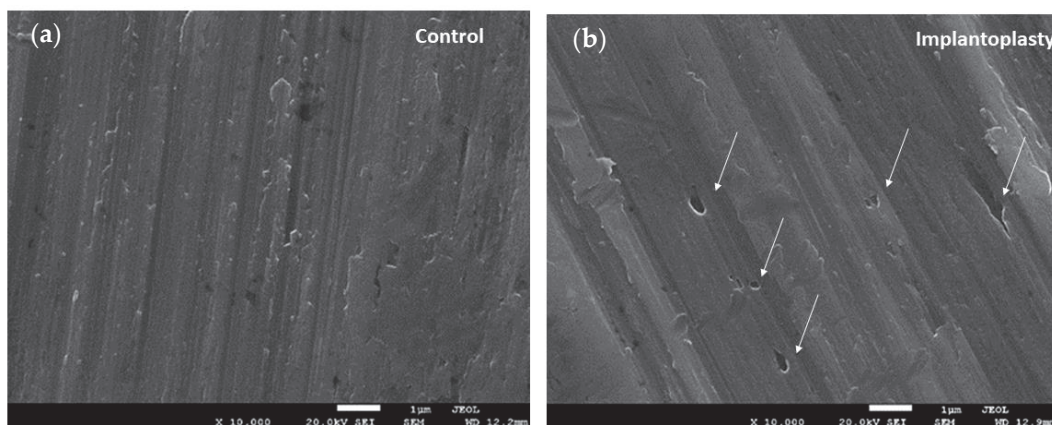


Figure 7. SEM images of the surfaces for (a) control and (b) implantoplasty samples.

4. Discussion

Nanoindentation tests showed that the Ti alloy particles released during implantoplasty were harder, probably because of the stress applied during machining. It is well known that when metals are machined, defects in the crystalline lattice (band slips, twins, etc.) increase the hardness of the metal to the point that it cannot absorb any more energy, causing it to fracture at those points. Thus, these particles have much higher internal energy than the rest of the dental implant. According to the laws of thermodynamics, the system will release energy to become more stable, thus being more susceptible to ion release and electrochemical corrosion; this can therefore generate non-cytocompatible oxides [3,46]. Although there is no joint wear in the oral cavity, implantoplasty milling procedures could have a similar effect, though not sustained over time. Moreover, in the oral cavity, the presence of physiological fluids and the stable temperature of 37 °C favor this release of ions and corrosion of the metal [28,47]. Therefore, from our point of view, the main risk of implantoplasty lies in the high internal energy of the metal debris produced, since its reaction with the medium to lower the internal energy levels may give rise to products or interactions that exert a toxic effect upon the physiological environment, especially human

cells. Thus, implantoplasty might imply a risk of contributing to implant failure over the medium to long term, due to aseptic bone loss. In addition, there is also the risk of an increased presence of metal ions in the blood and their accumulation in the organs.

As Figure 6 shows, there was an almost constant open corrosion potential over immersion time in all samples. This signal (potential) stability would be directly connected to the formation of a stable Ti-oxide passive film. The stability of this inert film depends to a great extent on the volume of the newly formed oxides. In the case of Ti6Al4V, there are several mixed oxides (non-stoichiometric oxides), which should be as similar as possible to the volume of the base-metal in order to protect the metal against corrosion. This happens particularly in the case of Ti6Al4V for all the oxides, which usually leads to the formation of thin passive films with oxide volumes very similar to the bulk metals, thus avoiding the formation of both cracks and breaks. This favors the passivity of the Ti6Al4V alloys.

The corrosion potential results showed that control samples had the best corrosion resistance. As-received material presented a good chemical homogeneity as a result of an annealing treatment. In addition, annealing heat treatment avoided the presence of residual stresses, which could favor the decrease of galvanic corrosion rates. Implantoplasty samples showed a decrease in the corrosion potential due to the residual stress induced by the machining process on the surface [48–52], which can enhance surface chemical reactivity during corrosion testing. As is well-known, machining of metals induces residual stresses, which can affect their in-service behavior, as reported by several authors [53,54]. Corrosion resistance can be decreased by the presence of other metallic elements in the mouth (stainless steel wires for orthodontics, metals for prosthetics, among others) that create a galvanic current due to the presence of metallic materials of different chemical natures in an electrochemical environment.

Finally, SEM shows the presence of pitting on the implantoplasty surfaces due to the electrochemical corrosion. Pitting involves a loss of material due to corrosion by migration of the reaction product (titanium oxide) into the physiological medium. These particles released as a result of corrosion and/or mechanical treatment, such as implantoplasty, have been reported to cause adverse allergic reactions in humans [55,56]. There is no current consensus on the risk of particles released from titanium implants; however, it would be prudent for clinicians to carefully evaluate the materials used, and to consider the potential risks of the individual constituents of any alloy, as indicated in this study.

5. Conclusions

Ti6Al4V alloy particles released during implantoplasty show higher hardness, mechanical strength, and compressive residual stresses than the control Ti6Al4V material. These compressive residual stresses, due to the higher deformation in the Widmanstätten microstructure, cause inferior corrosion behavior, both in open circuit potential and in potentiodynamic tests. Implantoplasty particles present worse corrosion resistances than the original samples, since their E_{CORR} , I_{CORR} , and corrosion rate values are higher, and the polarization resistance is lower. The increase in corrosion rate due to implantoplasty causes pitting on the surface of the samples. Clinicians must be aware of the potential risks of implantoplasty, because of a reduction in corrosion resistance among metal particles released during this procedure.

Author Contributions: Conceptualization: M.Á.S.-G., C.G.-E., E.V.-C., O.C.-F. and F.J.G.; methodology: M.Á.S.-G., C.G.-E., E.V.-C., O.C.-F. and F.J.G.; software: J.T.-S., M.M. and P.V.; validation: J.T.-S., M.M., P.V. and E.V.-C.; formal analysis: M.Á.S.-G., C.G.-E., E.V.-C., O.C.-F. and F.J.G.; investigation: J.T.-S., P.V. and M.M.; resources: E.V.-C. and M.Á.S.-G.; data curation, O.C.-F., C.G.-E., E.V.-C. and J.T.-S.; writing—original draft preparation: J.T.-S., P.V. and F.J.G.; writing—review and editing, M.Á.S.-G., C.G.-E., E.V.-C. and O.C.-F.; visualization: E.V.-C.; supervision: M.Á.S.-G., C.G.-E., E.V.-C., O.C.-F. and F.J.G.; project administration: E.V.-C.; funding acquisition: E.V.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the *Instituto de Salud Carlos III* through project PI20/01596 (co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF), a way to build Europe). In addition, this research received funding from the Spanish government for financial support through the projects, RTI2018-098075-B-C21, and RTI2018-098075-BC22, co-funded by the EU through the European Regional Development Funds (MINECO-FEDER, EU).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for institutional support, Dental implants were kindly provided by the Avinent Implant System, Santpedor, Spain.

Conflicts of Interest: Jorge Toledano-Serrabona has received no grants, personal fees, or non-financial support. Octavi Camps-Font has participated as co-investigator in clinical trials sponsored by Mundipharma (Cambridge, UK) and Menarini Recherche (Florence, Italy). He also reports grants and non-financial support from Avinent (Santpedor, Spain). Eduard Valmaseda-Castellón reports personal fees and non-financial support from MozoGrau (Valladolid, Spain). He is the Director of the Avinent—University of Barcelona research agreement (Càtedra UB–Avinent), with Avinent (Santpedor, Spain), and has received personal fees from BioHorizons Ibérica (Madrid, Spain), Inibsa Dental (Llíça de Vall, Spain), and Dentsply implants Iberia (Barcelona, Spain) outside the submitted work. In addition, Valmaseda-Castellón has participated as an investigator in clinical trials sponsored by Mundipharma (Cambridge, UK) and Geistlich (Wolhusen, Switzerland). Cosme Gay-Escoda reports grants, personal fees, and non-financial support from Mundipharma (Cambridge, UK) and Menarini Recherche (Florence, Italy). María Ángeles Sánchez-Garcés reports grants, personal fees, and non-financial support from Nobel Biocare, Zimmer, and Menarini Recherche (Florence, Italy). Pablo Verdeguer has received no grants, personal fees, or non-financial support. Mertixell Molmeneu has received no grants, personal fees, or non-financial support. F. Javier Gil reports grants from the Spanish government, European Union personal fees, and non-financial support from Klockner Dental Implants (Barcelona, Spain).

References

1. Alrabiah, M.; Alrahlah, A.; Al-Hamdan, R.S.; Al-Aali, K.A.; Labban, N.; Abduljabbar, T. Survival of adjacent-dental-implants in prediabetic and systemically healthy subjects at 5-years follow-up. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **2019**, *21*, 232–237. [\[CrossRef\]](#)
2. Francetti, L.; Cavalli, N.; Taschieri, S.; Corbella, S. Ten years follow-up retrospective study on implant survival rates and prevalence of peri-implantitis in implant-supported full-arch rehabilitations. *Clin. Oral Implant. Res.* **2019**, *30*, 252–260. [\[CrossRef\]](#)
3. Aparicio, C.; Gil, F.J.; Fonseca, C.; Barbosa, M.; Planell, J.A. Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials* **2003**, *24*, 263–273. [\[CrossRef\]](#)
4. Ratner, B.D. A Perspective on Titanium Biocompatibility. In *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*; Brunette, D.M., Tengvall, P., Textor, M., Thomsen, P., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2001; pp. 1–12.
5. Aparicio, C.; Rodríguez, D.; Gil, F.J. Variation of roughness and adhesion strength of deposited apatite layers on titanium dental implants. *Mat. Sci. Eng. C* **2011**, *31*, 320–324. [\[CrossRef\]](#)
6. Zhang, L.C.; Chen, L.Y. A review on biomedical titanium alloys: Recent progress and prospect. *Adv. Eng. Mater.* **2019**, *21*, 1801215. [\[CrossRef\]](#)
7. Dias Corpa Tardelli, J.; Bolfarini, C.; Cândido Dos Reis, A. Comparative analysis of corrosion resistance between beta titanium and Ti6Al4V alloys: A systematic review. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2020**, *62*, 126618. [\[CrossRef\]](#)
8. Berbel, L.O.; Banczek, E.; Karoussis, I.K.; Kotsakis, G.A.; Costa, I. Determinants of corrosion resistance of Ti6Al4V alloy dental implants in an In Vitro model of peri-implant inflammation. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210530.
9. Gai, X.; Bai, Y.; Li, S.; Hou, W.; Hao, Y.; Zhang, X.; Yang, R.; Misra, R. In-situ monitoring of the electrochemical behavior of cellular structured biomedical Ti6Al4V alloy fabricated by electron beam melting in simulated physiological fluid. *Acta Biomater* **2020**, *106*, 387–395. [\[CrossRef\]](#)
10. Willis, J.; Li, S.; Crean, S.J.; Barrak, F.N. Is titanium alloy Ti-6Al-4 V cytotoxic to gingival fibroblasts—A systematic review. *Clin. Exp. Dent. Res.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
11. Challa, V.S.; Mali, S.; Misra, R.D. Reduced toxicity and superior cellular response of preosteoblasts to Ti-6Al-7Nb alloy and comparison with Ti6Al4V. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101*, 2083–2089. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Schwarz, F.; Derks, J.; Monje, A.; Wang, H.L. Peri-implantitis. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, 246–266. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Figuero, E.; Graziani, E.; Sanz, I.; Herrera, D.; Sanz, M. Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontology* **2014**, *66*, 255–273. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

14. Batalha, V.C.; Bueno, R.A.; Fronchetti Junior, E.; Mariano, J.R.; Santin, G.C.; Freitas, K.M.S.; Ortiz, M.A.L.; Salmeron, S. Dental implants surface in vitro decontamination protocols. *Eur. J. Dent.* **2021**, *15*, 407–411. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Buser, D. Titanium for dental applications (I). In *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*; Brunette, D.M., Tengvall, P., Textor, M., Thomsen, P., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2001; pp. 875–888.
16. Thomsen, P.; Larsson, C.; Ericsson, L.E.; Sennerby, L.; Lausmaa, J.; Kasemo, B. Bone response to machined cast titanium implants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1997**, *8*, 653–665. [\[CrossRef\]](#)
17. Pegueroles, M.; Tonda-Turo, C.; Planell, J.A.; Gil, F.J.; Aparicio, C. Adsorption of fibronectin, fibrinogen, and albumin on TiO₂: Time-resolved kinetics, structural changes, and competition study. *Biointerphases* **2012**, *7*, 48–61. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Guillem, J.; Delgado, L.; Godoy-Gallardo, M.; Pegueroles, M.; Herrero, M.; Gil, F.J. Fibroblast adhesion and activation onto micro-machined titanium surfaces. *Clin. Oral Implant. Res.* **2013**, *24*, 770–780. [\[CrossRef\]](#)
19. Pegueroles, M.; Aparicio, C.; Bosio, M.; Engel, E.; Gil, F.J.; Planell, J.A.; Altankov, G. Spatial organization of osteoblast fibronectin-matrix on titanium surface—Effects of roughness, chemical heterogeneity, and surface free energy. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 291–301. [\[CrossRef\]](#)
20. Williams, D.F. Titanium for medical applications. In *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*; Brunette, D.M., Tengvall, P., Textor, M., Thomsen, P., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2001; pp. 13–24.
21. Schliephake, H.; Scharnweber, D. Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 2404–2414. [\[CrossRef\]](#)
22. Brunski, J.B. Classes of materials used in medicine. Metals. In *Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine*; Rutner, B., Hoffman, A., Schoen, F., Lemons, J., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1996; pp. 137–152.
23. Velasco-Ortega, E.; Jiménez-Guerra, A.; Monsalve-Guil, L.; Ortiz-García, I.; Nicolás-Silvente, A.I.; Segura-Egea, J.J.; Lopez-Lopez, J. Long-term clinical outcomes of treatment with dental implants with acid etched surface. *Materials* **2020**, *13*, 1553. [\[CrossRef\]](#)
24. Manero, J.M.; Gil, F.J.; Padrós, A.; Planell, J.A. Applications of environmental scanning electron microscopy (ESEM) in biomaterials field. *Microsc. Res. Tech.* **2003**, *61*, 469–480. [\[CrossRef\]](#)
25. Delgado-Ruiz, R.; Romanos, G. Potential causes of titanium particle and ion release in implant dentistry: A systematic review. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3585. [\[CrossRef\]](#)
26. Costa-Berenguer, X.; García-García, M.; Sánchez-Torres, A.; Sanz-Alonso, M.; Figueiredo, R.; Valmaseda-Castellón, E. Effect of implantoplasty on fracture resistance and surface roughness of standard diameter dental implants. *Clin. Oral Implant. Res.* **2018**, *29*, 46–54. [\[CrossRef\]](#)
27. Camps-Font, O.; González-Barnadas, A.; Mir-Mari, J.; Figueiredo, R.; Gay-Escoda, C.; Valmaseda-Castellón, E. Fracture resistance after implantoplasty in three implant-abutment connection designs. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **2020**, *25*, 691–699. [\[CrossRef\]](#)
28. Velasco, E.; Monsalve-Guil, L.; Jimenez, A.; Ortiz, I.; Moreno-Muñoz, J.; Nuñez-Marquez, E.; Pegueroles, M.; Pérez, R.A.; Gil, F.J. Importance of the roughness and residual stresses of dental implants on fatigue and osseointegration behavior. In vivo study in rabbits. *J. Oral Implantol.* **2016**, *42*, 469–476. [\[CrossRef\]](#)
29. Pérez, R.A.; Gargallo, J.; Altuna, P.; Herrero-Climent, M.; Gil, F.J. Fatigue of narrow dental implants: Influence of the hardening method. *Materials* **2020**, *13*, 1429. [\[CrossRef\]](#)
30. ASTM-E3-11. *Standard Guide for Preparation of Metallographic Specimens*; ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2017.
31. *Standard Reference Test Method for Making Potentiostatic and Potentiodynamic Anodic Polarization Measurements*; Technical Report no. ASTM G5-14e1; ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2014.
32. ISO 10993-5:2009. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. In *Biological Evaluation of Medical Devices*; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2009.
33. Mansfeld, F.; Kenkel, J.V. Laboratory studies of galvanic corrosion of aluminium alloys. In *Galvanic and Pitting Corrosion-Field and Laboratory Studies*; Baboian, R., France, W., Roew, L., Ryniewicz, J., Eds.; ASTM: Philadelphia, PA, USA, 1976; pp. 20–47.
34. Mansfeld, F. The polarization resistance technique for measuring corrosion currents. In *Advances in Corrosion Science and Technology*; Fontana, M.G., Staehle, R.W., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1976; pp. 89–92.
35. Canay, S.; Öktemer, M. In vitro corrosion behaviour of 13 prosthodontic alloys. *Quintessence Int.* **1992**, *23*, 279–287.
36. Senna, P.; Antoninha Del Bel Cury, A.; Kates, S.; Meirelles, L. Surface damage on dental implants with release of loose particles after insertion into bone. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2015**, *17*, 681–692. [\[CrossRef\]](#)
37. Barbieri, M.; Mencia, F.; Papi, P.; Rosella, D.; Di Carlo, S.; Valente, T.; Pompa, G. Corrosion behavior of dental implants immersed into human saliva: Preliminary results of an in vitro study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2017**, *21*, 3543–3548.
38. Boyer, R.; Welsch, G.; Collings, W. *Materials Properties Handbook: Titanium Alloys*; ASM International: Novelty, OH, USA, 1994.
39. Reclaru, L.; Meyer, J.M. Study of corrosion between a titanium implant and dental alloys. *J. Dent.* **1994**, *22*, 159–168. [\[CrossRef\]](#)
40. Ginebra, M.P.; Gil, F.J.; Manero, J.M.; Planell, J.A. Formation of α -Widmanstätten structure: Effects of grain size and cooling rate on the Widmanstätten morphologies and on the mechanical properties in Ti6Al4V alloy. *J. Alloys Compd.* **2001**, *329*, 142–152.
41. Gil, F.J.; Manero, J.M.; Ginebra, M.P.; Planell, J.A. The effect of cooling rate on the cyclic deformation of β -annealed Ti6Al4V. *Mat. Sci. Eng.* **2003**, *349*, 150–155. [\[CrossRef\]](#)
42. Manero, J.M.; Gil, F.J.; Planell, J.A. Deformation mechanisms of Ti6Al4V alloy with a martensitic microstructure subjected to oligocyclic fatigue. *Acta Mater.* **2000**, *48*, 3353–3359. [\[CrossRef\]](#)

43. Gil, F.J.; Planell, J.A.; Padrós, A.; Planell, J.A. Fracture and fatigue behaviour of shot blasted titanium dental implants. *Impl. Dent.* **2002**, *11*, 28–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Porter, D.A.; Easterling, K.E.; Sherif, M. *Phase Transformation in Metals and Alloys*, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2013.
45. Geis-Gerstorfer, J. In vitro corrosion measurements of dental alloys. *J. Dent.* **1994**, *22*, 247–251. [[CrossRef](#)]
46. Gil, F.J.; Planell, J.A.; Padrós, A.; Aparicio, C. The effect of shot blasting and heat treatment on the fatigue behavior of titanium for dental implant applications. *Dent. Mater.* **2007**, *23*, 486–491. [[CrossRef](#)]
47. Gil, F.J.; Espinar, E.; Llamas, J.M.; Sevilla, P. Fatigue life of bioactive titanium dental implants treated by means of grit-blasting and thermo-chemical treatment. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* **2014**, *16*, 273–281. [[CrossRef](#)]
48. Wataha, J.C.; Lockwood, P.E.; Khajotia, S.S. Effect of pH on element release from dental casting alloys. *J. Prosthet. Dent.* **1998**, *80*, 691–698. [[CrossRef](#)]
49. Gil, F.J.; Rodríguez, D.; Planell, J.A.; Cortada, M.; Giner, L.; Costa, S. Galvanic corrosion behaviour of Titanium implants coupled to dental alloys. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* **2000**, *11*, 287–293. [[CrossRef](#)]
50. Brånemark, P.I.; Hansson, L.; Adell, R.; Lindstrom, U.; Hallen, J.; Ohman, O. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.* **1977**, *16*, 1–132. [[PubMed](#)]
51. Adell, R.; Lekholm, U.; Rocker, U.; Brånemark, P.I. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the treatment of the edentulous jaw. *Int. J. Oral Surg.* **1981**, *6*, 387–416. [[CrossRef](#)]
52. Sarkar, N.K.; Fuys, R.A.; Stanford, J.W. Applications of electrochemical techniques to characterize the corrosion of dental alloys. In *Corrosion and Degradation of Implant Materials*; Syrett, B.C., Acharya, A., Eds.; ASTM: Philadelphia, PA, USA, 1979; pp. 277–294.
53. Hosoki, M.; Bando, E.; Asaoka, K.; Takeuchi, H.; Nishigawa, K. Assessment of allergic hypersensitivity to dental materials. *Biomed. Mater. Eng.* **2009**, *19*, 53–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Mombelli, A.; Hashim, D.; Cionca, N. What is the impact of titanium particles and bioocorrosion on implant survival and complications? A critical review. *Clin. Oral Implant. Res.* **2018**, *29*, 37–53. [[CrossRef](#)]
55. Harloff, T.; Hönle, W.; Holzwarth, U.; Bader, R.; Ythomas, P.; Schuh, A. Titanium allergy or not? “Impurity” of titanium implant materials. *Health* **2010**, *2*, 306–310. [[CrossRef](#)]
56. Chaturvedi, T. Allergy related to dental implant and its clinical significance. *Clin. Cosmet. Investig. Dent.* **2013**, *5*, 57–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Estudio 3:

Evaluación de la respuesta inflamatoria y osteogénica inducida por las partículas de titanio liberadas durante la implantoplastia de los implantes dentales.

- **Autores:** Toledano-Serrabona J, Bosch BM, Díez-Tercero L, Gil FJ, Camps-Font O, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ.
 - **Título:** Evaluation of the inflammatory and osteogenic response induced by titanium particles released during implantoplasty of dental implants.
 - **Revista:** Scientific Reports
 - **Factor de impacto (2021):** 4.996
 - **Posición JCR (Multidisciplinary Sciences):** 19/73 (Segundo cuartil)
 - **Referencia completa:** Toledano-Serrabona J, Bosch BM, Díez-Tercero L, Gil FJ, Camps-Font O, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ. Evaluation of the inflammatory and osteogenic response induced by titanium particles released during implantoplasty of dental implants. Sci Rep. 2022;12:15790.
 - **DOI:** 10.1038/s41598-022-20100-2
-

Objetivo

Evaluar la respuesta inflamatoria y osteogénica inducida por las partículas metálicas liberadas de la implantoplastia.

Material y Método

Partículas metálicas de Ti

En el presente estudio in vitro, se utilizó un protocolo previamente publicado para recoger las partículas metálicas liberadas durante la implantoplastia de los implantes dentales Ti6Al4V (334,335). Con el objetivo de imitar el procedimiento clínico de la implantoplastia, se recogieron partículas metálicas de implantes dentales de Ti grado V (Ti6Al4V) utilizando un procedimiento estandarizado que consistía en el uso secuencial de una fresa de carburo de tungsteno de grano fino y dos pulidores de carburo de silicio (257). La caracterización de la muestra incluyendo la composición, la granulometría, la estructura cristalina, la morfología, la liberación de iones, la nanoindentación y el comportamiento a la corrosión se describió en publicaciones anteriores (334,335). Por otro lado, se compararon los cultivos de células inflamatorias y osteogénicas utilizando como control partículas de Ti comercialmente puro NanoShel® (Chapel St., Reino Unido), y partículas de la aleación de Ti (Ti6Al4V). El tamaño de partícula de este polvo de Ti c.p. osciló entre 30 y 70 nm, un rango similar a algunas partículas metálicas liberadas durante la implantoplastia (334).

Esterilización de la muestra y obtención de los extractos

Esterilizamos por separado las partículas de implantoplastia (experimental) y de Ti c.p. (control) con etanol de 96°. Este último se eliminó mediante tres ciclos de centrifugación a 7200 r.p.m. durante 5 minutos y lavado con Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EE.UU.). Tras la última centrifugación, se descartó el DPBS y se añadió el volumen necesario de medio de

cultivo celular para obtener una concentración final de 0.2 g de muestra por mL de medio. Los ensayos celulares se llevaron a cabo mediante un cultivo indirecto con extractos siguiendo las indicaciones del apartado 8.2 de la norma ISO 10993-5: se utilizó el medio de cultivo que había sido previamente expuesto a las partículas metálicas para llevar a cabo los ensayos.

Ambas muestras (Ti6Al4V y Ti c.p.) se incubaron durante 72 horas a 37 °C. En el caso de los ensayos realizados con la línea celular de macrófagos THP-1, las partículas metálicas se incubaron en medio suplementado Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich®, Sant Louis, EE.UU.), mientras que en los ensayos con BM-MSCs se utilizó un medio osteogénico (Sigma-Aldrich®, Sant Louis, EE.UU.).

Ensayo celular y diferenciación de la línea celular de macrófagos THP-1

La línea celular de macrófagos THP-1 se obtuvo de DSMZ (ACC 16) (Braunschweig, Alemania) y el cultivo celular en suspensión se mantuvo a 3×10^5 células/mL en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®, Sant Louis, EE.UU.) complementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich®, Sant Louis, EE.UU.) y un 1 % de penicilina-estreptomicina (Fisher Scientific, Hampton, EE.UU.). Las células se cultivaron en un incubador con control de humedad a 37 °C y con un suministro de CO₂ del 5 %. Para mejorar la adhesión de las células a las placas de cultivo, las sembramos a una densidad de 3×10^4 células/cm² en presencia PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich®, Sant Louis, EE.UU.) durante 6 horas. A continuación, se retiró el medio con PMA, se lavó con DPBS y se expusieron las células a los extractos obtenidos previamente. En todos los ensayos, las células cultivadas con un medio que contenía una concentración de 100 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) (Sigma-Aldrich®, Sant Louis, EE.UU.) se utilizaron como control positivo para la inflamación (336), y las células cultivadas sin extracto (TCP) se utilizaron como controles negativos de la inflamación.

Análisis de la citotoxicidad en macrófagos

Se realizó un ensayo de citotoxicidad por contacto indirecto según las directrices especificadas en la norma UNE EN ISO 10993-5: "Evaluación biológica de productos sanitarios" parte 5, titulada: "Pruebas de citotoxicidad in vitro". La citotoxicidad se calculó con el índice de supervivencia celular, que indica citotoxicidad a < 80 %.

Las células se incubaron durante 24 y 48 horas con diferentes diluciones del extracto: extracto sin diluir y diluido 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000, utilizando medio completo para las diluciones. Se evaluaron las células por microscopía óptica para verificar la adhesión y morfología, antes y después de ponerlas en contacto con los extractos. Una vez finalizado el ensayo, evaluamos la viabilidad celular mediante la actividad metabólica utilizando el reactivo Resazurin Sodium Salt (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EE.UU.). Para ello, cultivamos las células en su medio con resazurin (10 µg/mL) durante 3 horas en la incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂. A continuación, después de 24 y 48 horas de cultivo, medimos la absorbancia a 570 y 600 nm utilizando un lector de placas (Infinite® 200 PRO, Tecan, Männedorf, Suiza).

Análisis de la expresión génica en macrófagos

La expresión génica se analizó mediante reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTqPCR). Analizamos marcadores pro-inflamatorios (CCR7, TNFα e IL1β), y anti-inflamatorios (CD206, TGFβ e IL10). A su vez, el RNA se aisló según las recomendaciones del fabricante con el kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), que incluía el tratamiento con DNasa. Una vez extraído, cuantificamos el RNA utilizando un lector de microplacas (Take3, Bio-Tek, Winooski, EE.UU.). A continuación, retrotranscribimos el RNA en cDNA utilizando el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche, Basilea, Suiza) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Utilizamos la qPCR para detectar la expresión génica

con el kit QuantiNova SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden, Alemania): 10 ng de cDNA se amplificaron mediante un paso inicial de activación de dos minutos a 95°C, desnaturalización durante 5 segundos a 95°C y 40 ciclos de hibridación/extensión durante 10 segundos a 60°C empleando el sistema CFX96 Real-Time (BioRad, Hercules, EE.UU.). Los cebadores utilizados para detectar genes específicos en la amplificación se detallan en la Tabla 13. Normalizamos la expresión de los genes al umbral de ciclo medio (Ct) del gen constitutivo β -actina. Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para comparar la expresión de mRNA entre condiciones, tomando como referencia el valor de las células cultivadas en TCP.

Tabla 13. Secuencia de los cebadores empleados en el análisis de la expresión génica.

		Gen	Directo (Secuencia 5'-3')	Inverso (Secuencia 5'-3')
Genes asociados con inflamación	M1 (pro-inflamatorio)	TNF α	TTCCAGACTTCCTTGAGACACG	AAACATGTCTGAGCCAAGGC
		IL1 β	GACACATGGGATAACGAGGC	ACGCAGGACAGGTACAGATT
		CCR7	GGCTGGTCGTGTTGACCTAT	ACGTAGCGGTCAATGCTGAT
	M2 (anti-inflamatorio)	IL10	AAGCCTGACCACGCTTTCTA	ATGAAGTGGTTGGGGAATGA
		TGF β	TTGATGTCAACCGAGTTGTG	TGATGTCCACTTGCACTGTG
		CD206	CCTGGAAAAAGCTGTGTGTGCACAGTGGTGTGCCCTTTTGC	
Genes asociados con osteogénesis		Runx2	CCCGTGGCCTTCAAGGT	CGTTACCCGCCATGACAGTA
		ALP	GGAACCTCTGACCCTTGACC	TCCTGTTCAGCTCGTACTGC
		OC	CGCCTGGGTCTCTTCACTAC	CTCACACTCCTCGCCCTATT
Gen constitutivo		β -actina	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

Análisis de la liberación de citoquinas en macrófagos

Una vez cultivados los macrófagos con los extractos durante 24 y 48 horas, recogimos los sobrenadantes para cuantificar la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL1 β) y antiinflamatorias (IL10) por parte de los macrófagos. La cuantificación se llevó a cabo utilizando kits ELISA (Thermofisher Scientific, Waltham, EE.UU.) y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Ensayo celular y diferenciación de las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea humana (BM-MSCs)

Las BM-MSCs se obtuvieron de ATCC (PCS-500-012) y se cultivaron en el medio de cultivo Mesenchymal Stem Cell Basal (ATCC; PCS-500-030) complementado con 125 pg/mL de rhFGF básico, 15 ng/mL de rhIGF-1, 7 % de FBS, 2.4 mM de L-alanil-L-glutamina (ATCC; PCS-500-041) y 1 % de penicilina-estreptomicina (Fisher Scientific, Hampton, EE.UU.). Mantuvimos la densidad del cultivo celular a 3000 células/cm². Posteriormente, para el ensayo de citotoxicidad, las BM-MSC se sembraron a una densidad de 9500 células/cm², mientras que, para los ensayos de expresión génica, actividad y proliferación de la fosfatasa alcalina (ALP) se sembraron a una densidad de 8000 células/cm². En todos los ensayos, los extractos se generaron utilizando un medio osteogénico, compuesto por un medio suplementado con 10 mM de β -glicerofosfato, 50 μ g/mL de ácido ascórbico y 0.1 μ M de dexametasona (Sigma-Aldrich®, Sant Louis, EE.UU.). Como control, utilizamos BM-MSCs expuestas al medio osteogénico, pero sin contacto con las partículas metálicas.

Análisis de citotoxicidad en BM-MSCs

Las BM-MSC fueron expuestas durante 3 y 7 días a diferentes diluciones de los extractos realizados en medio osteogénico: extracto sin diluir y diluido 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000. A continuación, se analizó la actividad metabólica mediante el ensayo de reducción de resazurina. Las BM-MSC se incubaron durante 45 minutos a 37 °C en presencia de un medio con una concentración de 50 μ g/mL de sal sódica de resazurina. La reducción de la resazurina se cuantificó de la misma manera que se describe en las secciones anteriores.

Análisis de la expresión génica en BM-MSCs

La expresión génica se analizó en los días 3, 7, 14 y 21 mediante RTqPCR utilizando el mismo protocolo que el empleado para los ensayos de expresión génica del THP-1. Los genes analizados fueron Runx2, fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC). Los cebadores utilizados para amplificar estos genes se describen en la Tabla 13.

Ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina (ALP)

Para cuantificar la actividad de la ALP, empleamos un método colorimétrico basado en la conversión de p-nitrofenil fosfato en p-nitrofenol en presencia de ALP. Lisamos las muestras cultivadas con los extractos y con el medio osteogénico con 200 μ L de Tritón X-100 al 0.1 % en tampón 1xTE (Sigma-Aldrich®, Sant Louis, EE.UU.), seguido de tres ciclos de congelación-descongelación. Posteriormente, se combinaron 50 μ L de muestra con 50 μ L de una mezcla en proporciones 1:1:1 de tampón 2-amino-2-metil-1-propanol 1.5 M (Sigma-Aldrich®, Sant Louis, EE.UU.), solución de sustrato de fosfatasa 20 mM (Sigma-Aldrich®, Sant Louis, EE.UU.) y 1 mM $MgCl_2$. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C, y detuvimos la reacción utilizando 1 M de NaOH. La producción de p-nitrofenol se cuantificó midiendo la absorbancia a 405 nm y comparándola con una curva estándar preparada con concentraciones conocidas de p-nitrofenol. Los resultados se normalizaron con los obtenidos en el ensayo de proliferación. La proliferación celular se cuantificó midiendo la cantidad de dsDNA en las muestras con el kit Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay (Invitrogen, Waltham, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se mezclaron 100 μ L de muestra y 100 μ L de una dilución 1:200 del reactivo PicoGreen en una placa negra de 96 pocillos.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, con la excepción de la actividad ALP que se midió por cuadruplicado. Los datos se expresaron con la media y la

desviación típica. El análisis estadístico fue implementado empleando MINITAB® (versión 18, Minitab Inc.). Se utilizaron estadísticos no paramétricos ya que, aunque se confirmó la distribución normal de cada población de datos (test de normalidad Anderson-Darling), no se pudo confirmar la igualdad de varianzas (test de Barlett y Levene para la homogeneidad de varianzas). Por lo tanto, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para las comparaciones múltiples y la prueba de U de Mann-Whitney para las comparaciones individuales. El nivel de significación se aceptó con $p < 0.05$.

Resultados

Análisis de la citotoxicidad en macrófagos

Como se muestra en la Figura 37, las células cultivadas con los extractos no diluidos de partículas de Ti6Al4V y Ti y su dilución 1:2 fueron citotóxicas a las 24 y 48 horas. Además, los extractos de partículas de Ti6Al4V fueron igualmente citotóxicos a la dilución 1:10 tanto a las 24 como a las 48 horas. Por esta razón, la respuesta inflamatoria se ensayó con la dilución considerada no citotóxica (1:100).

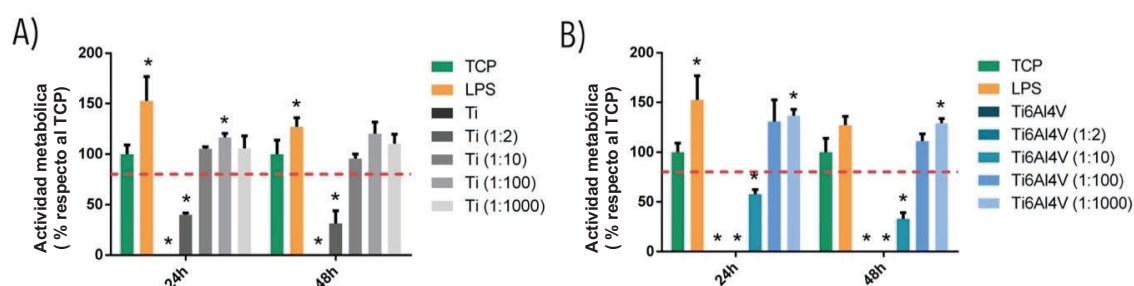


Figura 37. Efecto de las partículas de Ti (A) y de Ti6Al4V (B) sobre la actividad metabólica de las células THP-1 después de 24 horas y 48 horas de cultivo. Los resultados de la actividad metabólica se representaron como porcentaje respecto a un control no estimulado (TCP) y se compararon con el TCP de cada día. Los valores de actividad metabólica < 80 % (línea roja) se consideraron citotóxicos. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al TCP ($p < 0.05$) se representaron con *.

Análisis de la expresión génica en macrófagos

La estimulación con LPS provocó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de la expresión de los marcadores proinflamatorios ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ y CCR7) en comparación con el TCP, así como una disminución de la expresión de CD206 , que es un marcador anti-inflamatorio (Figura 38).

Cuando los macrófagos se estimularon con los extractos de Ti, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de la expresión de $\text{TNF}\alpha$ a las 48 horas, mientras que la expresión de $\text{IL1}\beta$ disminuyó a las 24 horas y volvió a aumentar a las 48 horas. Además, a las 48 horas se produjo un aumento significativo de la expresión de IL10 , así como una disminución de la expresión de CD206 . Por otro lado, los macrófagos estimulados con extractos de Ti6Al4V mostraron un aumento de la expresión de $\text{TNF}\alpha$ a las 48 horas, mientras que la expresión de $\text{IL1}\beta$ disminuyó a las 24 horas, pero sin diferencias respecto al TCP a las 48 horas. Los extractos de Ti6Al4V indujeron una disminución de la expresión del marcador de superficie pro-inflamatorio CCR7 .

Por último, en los extractos de Ti6Al4V se produjo un aumento de la expresión de $\text{TNF}\alpha$ e IL10 , así como una disminución de la expresión de los marcadores CCR7 y CD206 a las 48 horas en comparación con los extractos de Ti comercialmente puro ($p < 0.05$).

Respuesta proinflamatoria Respuesta antiinflamatoria

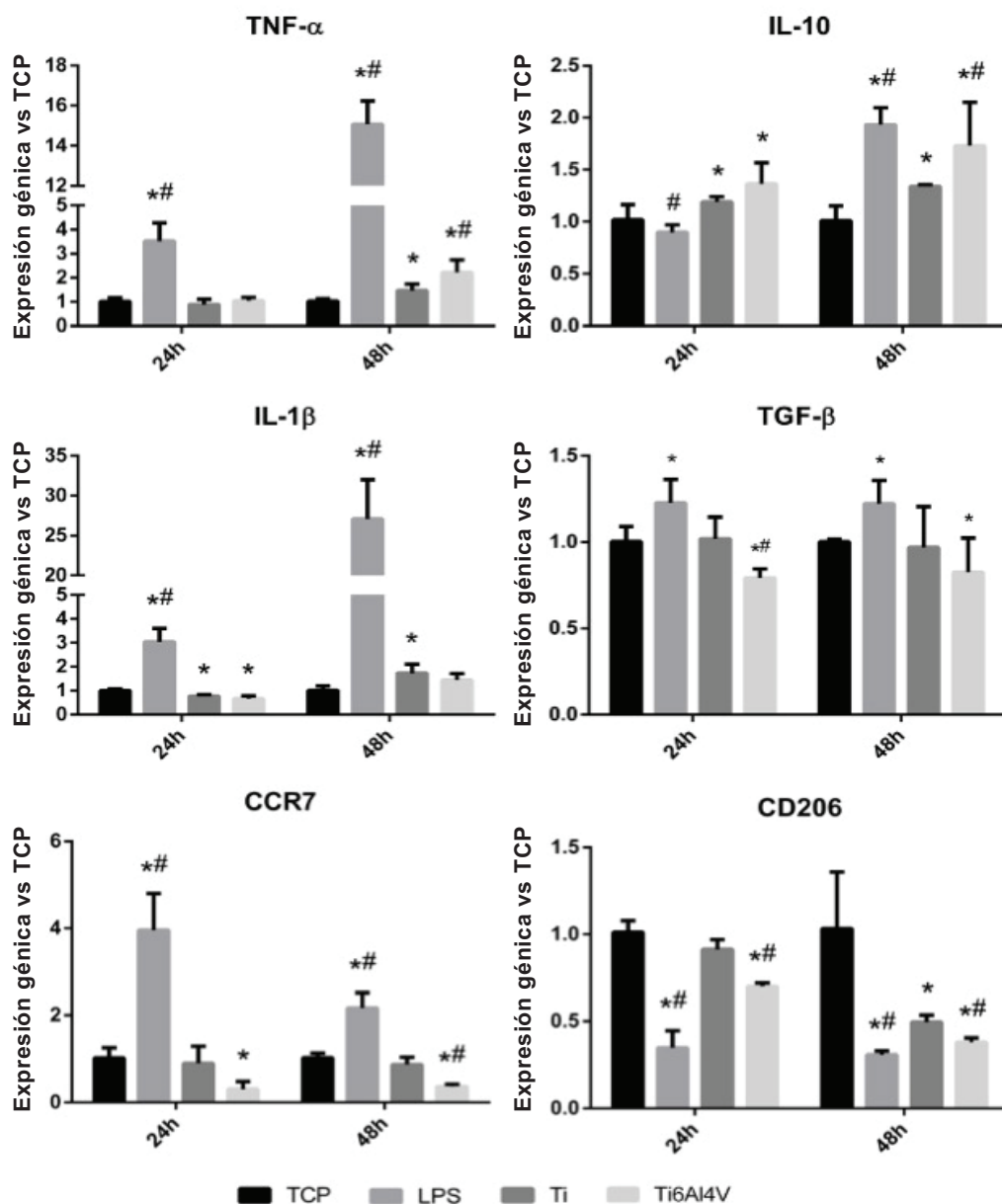


Figura 38. Efecto de la estimulación con extractos de Ti y de Ti6Al4V sobre la expresión génica de los marcadores proinflamatorios (TNF α , IL1 β y CCR7) y antiinflamatorios (IL10, TGF β y CD206) en la línea celular de macrófago THP-1. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representaron con * cuando la comparativa se hizo respecto al TCP y con el símbolo # cuando la comparativa se realizó respecto al Ti.

Análisis de la liberación de citoquinas en macrófagos

Solo el LPS (control positivo de la inflamación) fue capaz de inducir la liberación de la citoquina pro-inflamatoria TNF α a las 24 horas de estimulación. Por otra parte, los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL1 β fueron significativamente mayores

($p < 0.05$) en comparación con el TCP en presencia de LPS y extractos de Ti, pero no con Ti6Al4V (Figura 39).

A las 24 horas de la estimulación, se observó un aumento significativo de la expresión de la citoquina proinflamatoria IL10 en presencia de los extractos de Ti6Al4V ($p < 0.05$), pero detectamos una disminución de la IL10 a las 48 horas. En cuanto a los extractos de Ti, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al TCP (Figura 39).

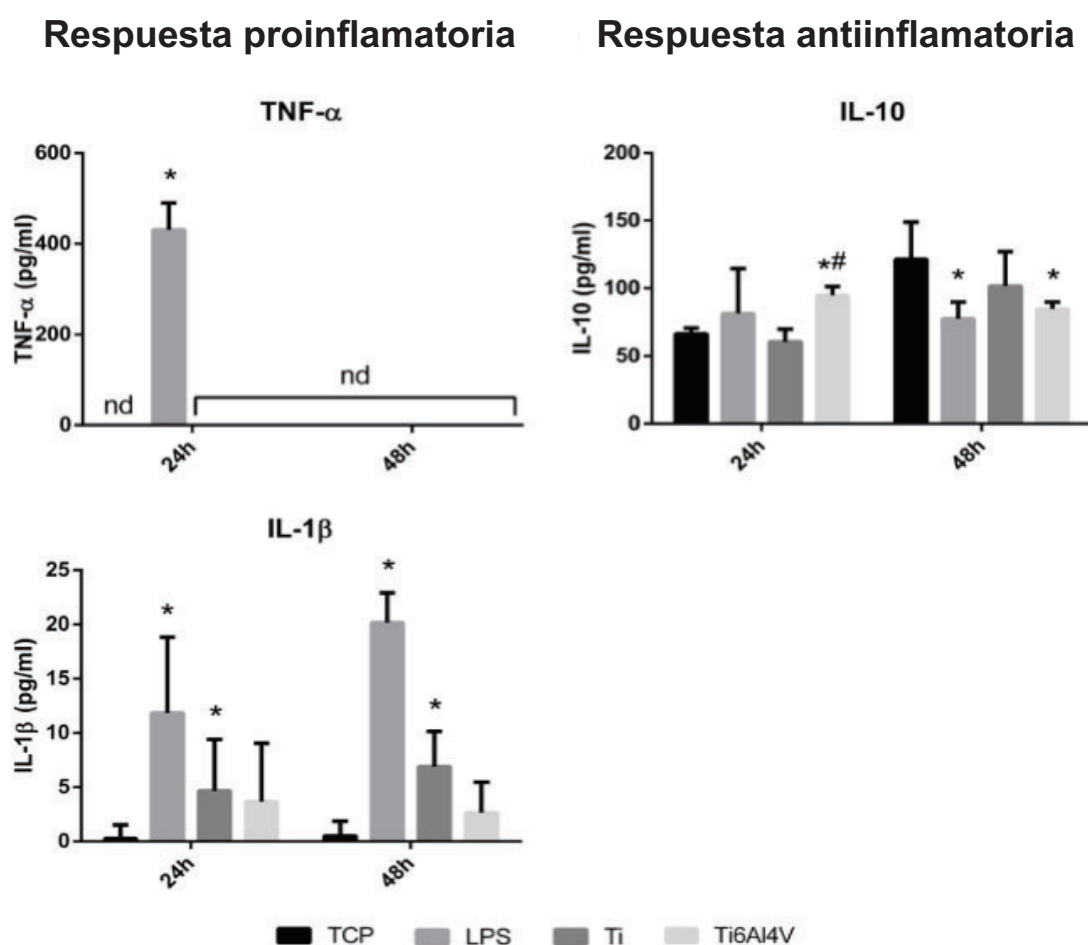


Figura 39. Efecto de la estimulación con extractos de Ti y de Ti6Al4V sobre la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL1 β) y antiinflamatorias (IL10) en la línea celular de macrófagos THP-1. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representaron con * cuando la comparativa se hizo respecto al TCP y con el símbolo # cuando la comparativa se realizó respecto al Ti.

Análisis de la citotoxicidad en BM-MSCs

Como se muestra en la Figura 40, los extractos no diluidos de partículas de Ti6Al4V y Ti y su dilución 1:2 fueron citotóxicos para las BM-MSCs a los 3 y 7 días. Además, los extractos de las partículas de Ti6Al4V también fueron citotóxicos a una dilución de 1:10 tanto a los 3 como a los 7 días. Aunque se observó una disminución estadísticamente significativa de la actividad metabólica de los extractos de Ti a una dilución de 1:10 y 1:100 y de los extractos de Ti6Al4V a una dilución de 1:100, estas concentraciones se consideraron no citotóxicas porque estaban por encima del umbral de citotoxicidad. Por lo tanto, para los siguientes experimentos correspondientes al análisis de la respuesta osteogénica, se utilizó la dilución 1:100 en ambos tipos de extractos.

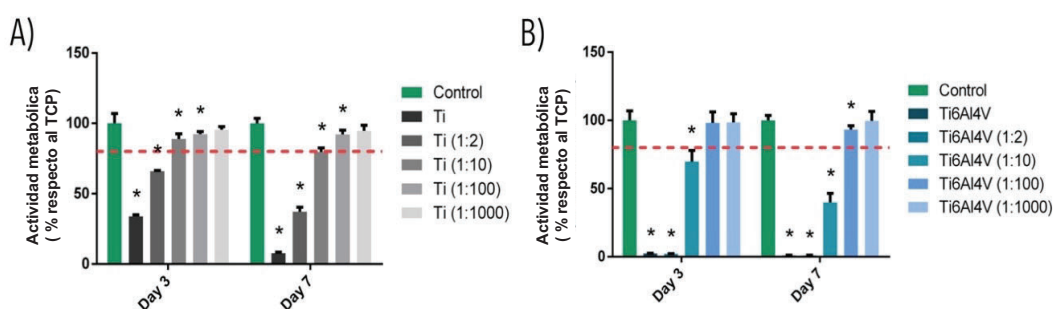


Figura 40. Efecto de las partículas de Ti (A) y de Ti6Al4V (B) sobre la actividad metabólica de las células BM-MSCs después de 3 y 7 días de cultivo. Los resultados de la actividad metabólica se representaron como porcentaje respecto a un control no estimulado (TCP) y se compararon con el TCP cada día. Los valores de actividad metabólica < 80 % (línea roja) se consideraron citotóxicos. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al TCP ($p < 0.05$) se representaron con *.

Análisis de la expresión génica en BM-MSCs

Los extractos de Ti6Al4V produjeron una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la expresión de Runx2 en los días 7, 14 y 21 en comparación con el medio osteogénico de control, y en los días 14 y 21 en comparación con las células estimuladas con el extracto de Ti (Figura 41). Además, la estimulación con extractos de Ti6Al4V indujo una disminución de la expresión del marcador OC en los días 14 y 21 en comparación con el medio osteogénico de control y con los extractos de Ti. Por

otro lado, la estimulación con los extractos de Ti no produjo diferencias significativas frente a los controles en cuanto a la expresión de Runx2.

En cuanto a la expresión de ALP, el uso de los extractos produjo una disminución significativa en el día 3, mientras que en el día 14 esta reducción solo se pudo observar en los extractos de Ti. En el día 14, la expresión en presencia de ambos extractos superó significativamente ($p < 0.05$) a los controles.

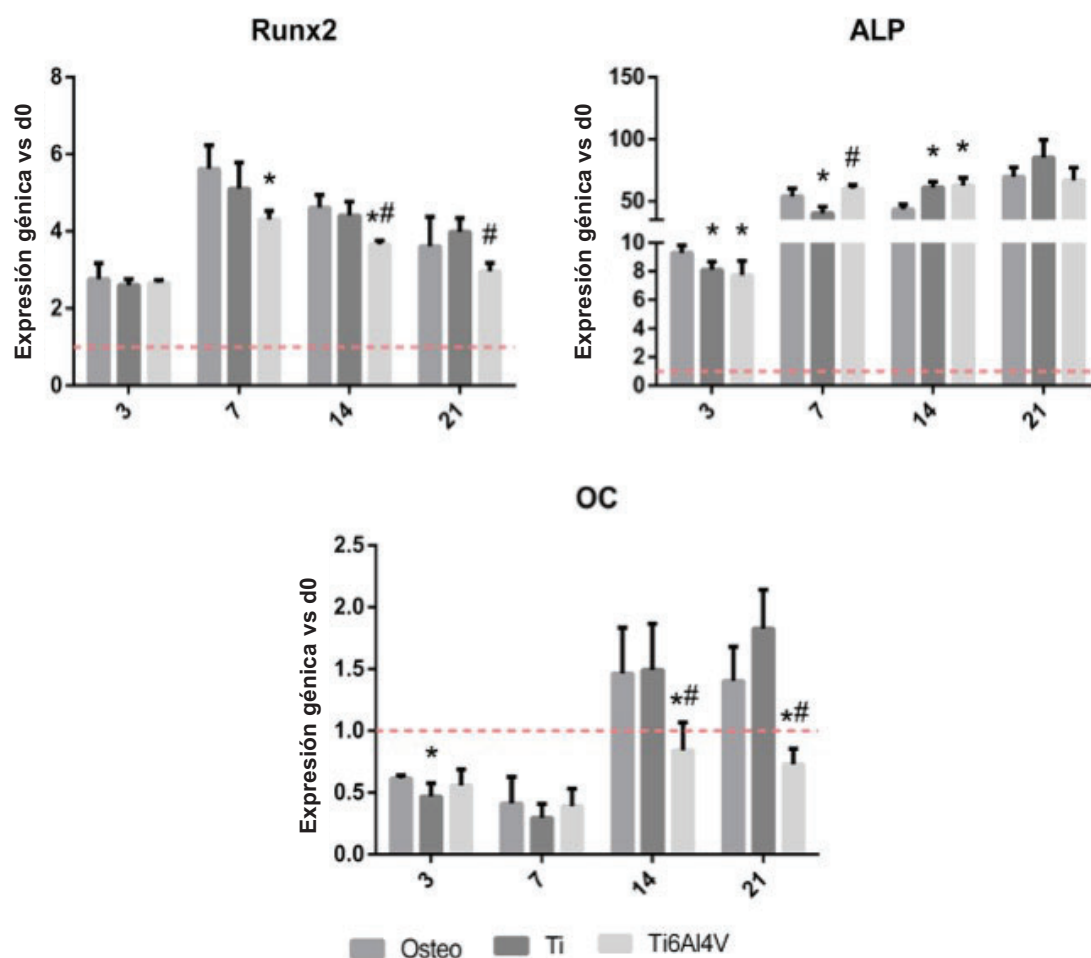


Figura 41. Efecto de la estimulación con extractos de Ti y de Ti6Al4V sobre la expresión génica de los marcadores osteogénicos Runx2, ALP y OC en un cultivo primario de células mesenquimales humanas (BM-MSCs). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representaron con * cuando la comparativa se realizó respecto al control del medio osteogénico (Osteo) y con el símbolo # cuando la comparativa se hizo respecto al Ti.

Ensayo de la actividad de la ALP

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la ALP cuando se comparó con el medio osteogénico de control. Los extractos de Ti6Al4V y Ti tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que estos extractos no tuvieron una influencia detectable sobre la expresión y la actividad de la proteína ALP (Figura 42).

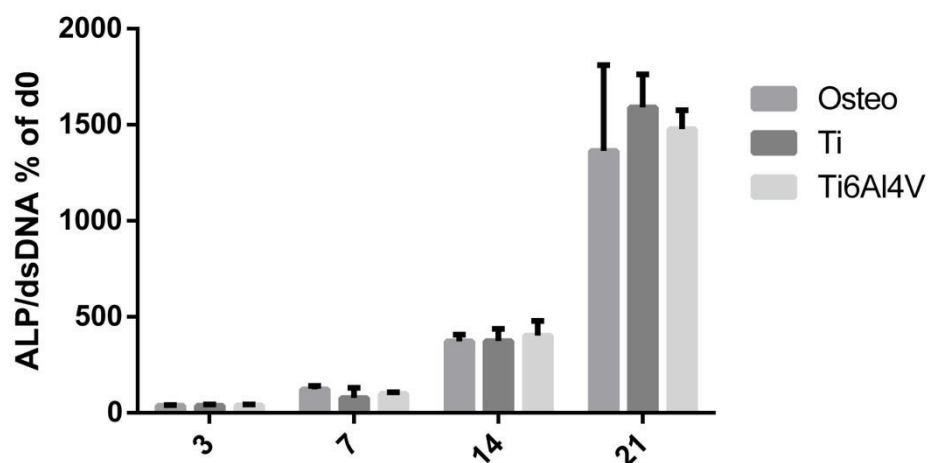


Figura 42. Efecto de la estimulación con extractos de Ti y de Ti6Al4V sobre la actividad ALP en un cultivo primario de células mesenquimales humanas (BM-MSCs). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representaron con * cuando la comparativa se hizo respecto al TCP y con el símbolo # cuando la comparativa se realizó respecto al Ti.

Artículo original



OPEN

Evaluation of the inflammatory and osteogenic response induced by titanium particles released during implantoplasty of dental implants

Jorge Toledano-Serrabona^{1,2}, Begoña M. Bosch³, Leire Díez-Tercero³, F. Javier Gil^{3,4}, Octavi Camps-Font^{1,2}, Eduard Valmaseda-Castellón^{1,2}, Cosme Gay-Escoda^{1,2} & M^a Ángeles Sánchez-Garcés^{1,2}

Implantoplasty is a mechanical decontamination technique that consists of removing the threads and polishing and smoothing the dental implant surface. During implantoplasty there is a large release of titanium metal particles that might provoke a proinflammatory response and reduce the viability of osteogenic cells. We analyze the inflammatory and osteogenic response induced by Ti6Al4V particles released during implantoplasty and by as-received commercially pure Ti particles. Macrophages stimulated with metal particles obtained by implantoplasty and with as-received Ti particles showed an increased proinflammatory expression of TNF- α and a decreased expression of TGF- β and CD206. Regarding cytokine release, there was an increase in IL-1 β , while IL-10 decreased. The osteogenic response of Ti6Al4V extracts showed a significant decrease in Runx2 and OC expression compared to the controls and commercially pure Ti extracts. There were no relevant changes in ALP activity. Thus, implantoplasty releases metal particles that seems to induce a pro-inflammatory response and reduce the expression of osteogenic markers.

Peri-implantitis is defined as a pathological condition caused by bacterial biofilms and characterized by inflammatory changes in the peri-implant mucosa, with progressive bone loss around an osseointegrated dental implant¹. This biological complication can jeopardize the implant-prosthetic restoration if left untreated. The treatment of peri-implant diseases includes the decontamination of the implant surface by means of mechanical, chemical or electrolytic techniques^{2–4}. It must be pointed out that the literature does not clearly indicate superiority of one specific decontamination protocol over the others⁴. In fact, most of these decontamination techniques are not able to completely remove the biofilm from the dental implant surface, probably due to the macro and micro-design of the implant and the defect configuration^{5–9}. Clinical studies have suggested that the resolution of the peri-implant disease may be influenced by other factors than the method of surface decontamination^{10–12}.

Several studies have confirmed the association between peri-implant diseases and bacterial biofilm^{1,13,14}. Nevertheless, other factors might cause inflammation and marginal bone loss around dental implants, as suggested by the 2017 World Workshop on the classification of peri-implant diseases¹. Among these factors, particles of titanium (Ti) and other metals seem to favour bone loss and inflammation of the peri-implant mucosa^{15–18}. Most implants are made of commercially pure titanium or alloys with other metals, and accumulation of Ti in peri-implant tissues has been associated with peri-implantitis¹⁹. Besides, Ti debris promotes DNA damage in oral epithelial cells through activation of the molecular markers CHK2 and BRCA1²⁰.

Macrophages are one of the principal elements in the inflammatory immune response and play an important role in bone homeostasis^{21,22}. As a result of the stimuli that these cells are exposed to, macrophages are able to polarize into M1 (proinflammatory phenotype) or M2 (anti-inflammatory phenotype)²³. In response

¹Department of Oral Surgery and Implantology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ²Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain. ³Bioengineering Institute of Technology, International University of Catalonia, Sant Cugat del Vallès, Spain. ⁴Faculty of Dentistry, International University of Catalonia, Sant Cugat del Vallès, Spain. ✉email: xavier.gil@uic.cat; ocamps@ub.edu; eduardvalmaseda@ub.edu

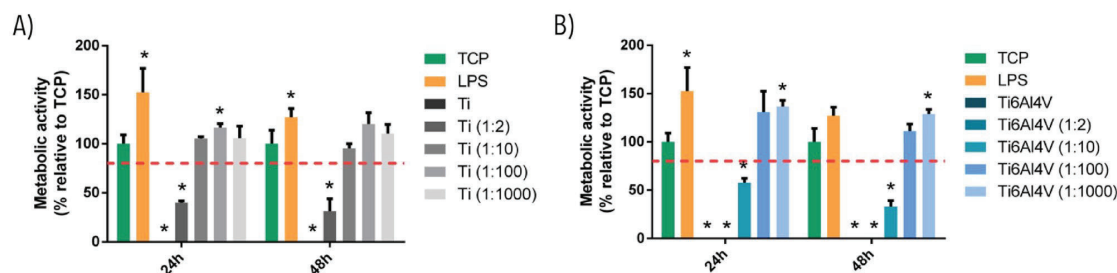


Figure 1. Effect of Ti (A) and Ti6Al4V (B) particles upon THP-1 cell metabolic activity after 24 h and 48 h culture. Metabolic activity results were represented as percentage relative to an unstimulated control (TCP) and compared with the TCP of each day. Values < 80% metabolic activity (red line) which were significantly different ($p < 0.05$) from TCP were considered cytotoxic. Statistically significant differences ($p < 0.05$) are represented with *.

to particulate foreign body material (i.e., wear metal particles) M1 macrophages can express different pro-inflammatory cytokines, chemokines and growth factors that favours osteoclastogenesis^{24,25}.

It has been suggested that metal particles may induce an aseptic bone loss around the dental implants^{16,26}. These metal particles can be released into the peri-implant tissues through different mechanisms, including implant insertion, corrosion, friction, or surface decontamination methods of the dental implant, such as implantoplasty (IP). In addition, fretting corrosion can also stimulate the release of metal ions and particles into peri-implant tissues in the absence of bacteria^{27–29}. Several in vitro cell-based assays in cultured human macrophages reported that Ti particles induce the secretion of pro-inflammatory cytokines^{17,30}. However, the immunological characteristics of metal particles released during IP remain unclear. Such debris has shown physicochemical properties characteristic of implant polishing and has been associated to lower corrosion resistance^{31,32}.

Thus, the main objective of this paper was to evaluate the inflammatory response induced by Ti metal particles released during IP based on macrophage cell culture (THP-1). The secondary objective was to evaluate the osteogenic response triggered by such metal debris based on human bone marrow mesenchymal stem cell (BM-MSC) culture.

Results

Analysis of cytotoxicity in macrophage cell culture. As shown in Fig. 1, cells cultured with the undiluted extracts of Ti6Al4V and Ti particles and their 1:2 dilution were cytotoxic at 24 and 48 h. In addition, extracts of Ti6Al4V particles were likewise cytotoxic at 1:10 dilution at both 24 and 48 h. Hence, the inflammatory response was assayed with the dilution considered to be non-cytotoxic (1:100).

Macrophage gene expression analysis. Lipopolysaccharide (LPS) stimulation produced a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the expression of the proinflammatory markers (TNF- α , IL-1 β and CCR7) compared to TCP, as well as a decrease in the expression of CD206, which is an anti-inflammatory marker (Fig. 2).

When macrophages were stimulated with the Ti extracts, a significant increase ($p < 0.05$) in TNF- α expression was observed at 48 h of stimulation, while IL-1 β expression decreased at 24 h and increased again at 48 h. In addition, at 48 h there was a significant increase in IL-10 expression, as well as a decrease in CD206 expression. On the other hand, macrophages stimulated with Ti6Al4V extracts exhibited an increase in TNF- α expression at 48 h, while IL-1 β expression decreased at 24 h, but without differences versus TCP at 48 h. The Ti6Al4V extracts induced a decrease in the expression of the proinflammatory surface marker CCR7.

Lastly, in the Ti6Al4V extracts there was an increase in the expression of TNF- α and IL-10, as well as a decrease in the expression of the CCR7 and CD206 markers at 48 h compared to commercially pure Ti ($p < 0.05$).

Macrophage cytokine release analysis. Only LPS (positive control of inflammation) was able to induce the release of the proinflammatory cytokine TNF- α at 24 h of stimulation. On the other hand, the levels of the proinflammatory cytokine IL-1 β were significantly higher ($p < 0.05$) in comparison with TCP in the presence of LPS and Ti extracts, but not with Ti6Al4V (Fig. 3).

At 24 h of stimulation, a significant increase was observed in the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the presence of Ti6Al4V extracts ($p < 0.05$), but we detected a decrease in IL-10 at 48 h. Regarding the Ti extracts, no statistically significant differences were observed with respect to TCP (Fig. 3).

Analysis of cytotoxicity in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) culture. As shown in Fig. 4, undiluted extracts of Ti6Al4V and Ti particles and their 1:2 dilution were cytotoxic for BM-MSCs at 3 and 7 days. In addition, extracts of the alloy particles were likewise cytotoxic at 1:10 dilution at both 3 and 7 days. Although a statistically significant decrease in metabolic activity was observed for Ti extracts at 1:10 and 1:100 dilution and Ti6Al4V extracts at 1:100 dilution, these concentrations were considered to be non-cytotoxic, because they were above the cytotoxicity threshold. Therefore, for the following experiments corresponding to the analysis of osteogenic response, the 1:100 dilution was used in both types of extracts.

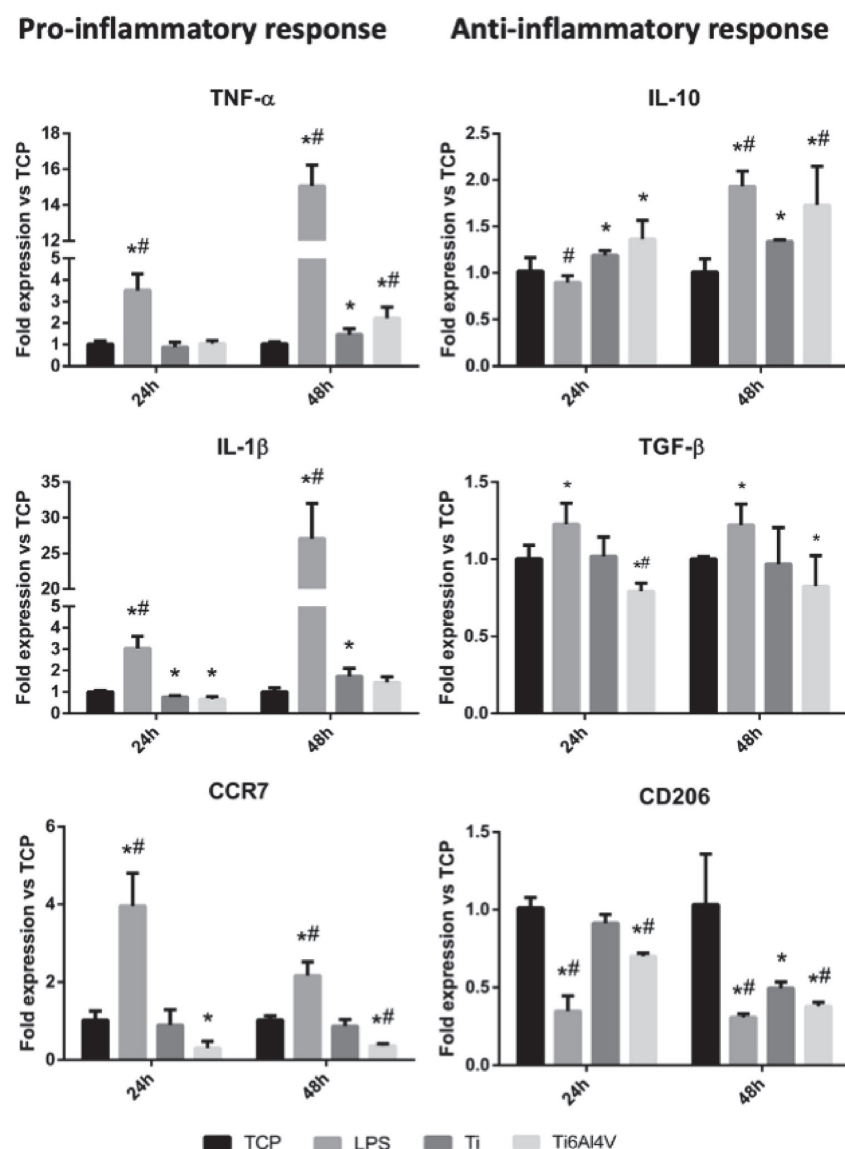


Figure 2. Effect of stimulation with Ti and Ti6Al4V alloy extracts upon gene expression of proinflammatory (TNF- α , IL-1 β and CCR7) and anti-inflammatory markers (IL-10, TGF- β and CD206) in the THP-1 macrophage cell line. Statistically significant differences ($p < 0.05$) are represented with * when comparison was made versus TCP and with the symbol # when comparison was made versus Ti.

BM-MSCs gene expression analysis. The Ti6Al4V extracts produced a significant decrease ($p < 0.05$) in Runx2 expression at days 7, 14 and 21 compared to the controls, and at days 14 and 21 compared to cells stimulated with Ti extract (Fig. 5). Additionally, stimulation with Ti6Al4V extracts induced a decrease in the expression of the OC marker at days 14 and 21 compared to the control osteogenic medium and to the Ti extracts. On the other hand, stimulation with the Ti extracts did not produce significant differences versus the controls in terms of Runx2 expression.

Regarding ALP expression, the use of extracts produced a significant decrease at day 3, while at day 14 this reduction could only be seen in Ti extracts. At day 14, expression in the presence of both extracts significantly ($p < 0.05$) exceeded the controls.

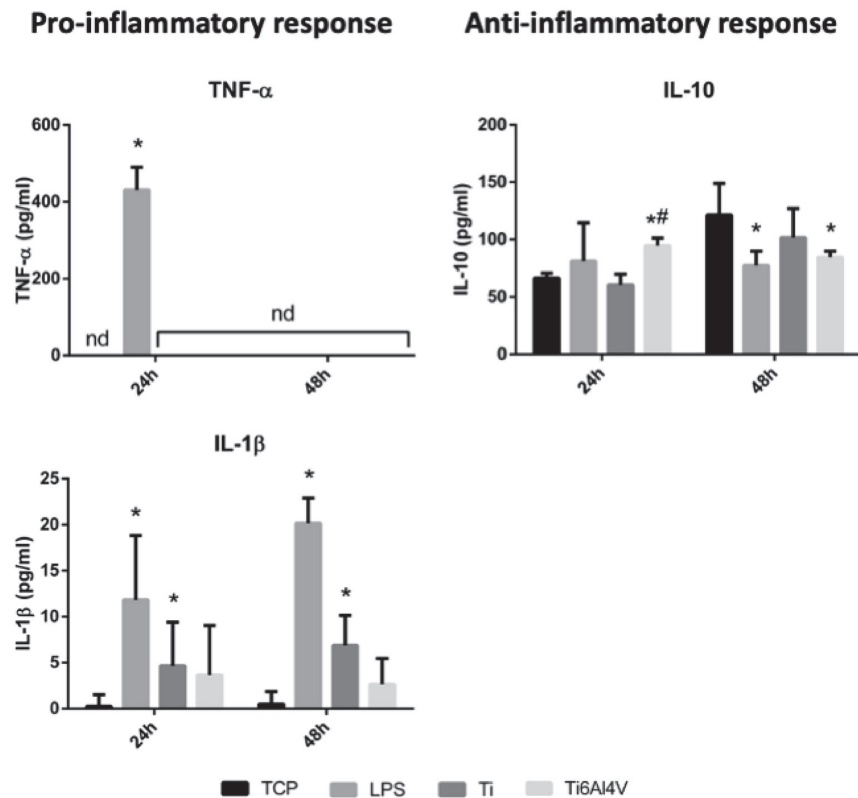


Figure 3. Effect of stimulation with Ti and Ti6Al4V alloy extracts upon the release of proinflammatory (TNF-α and IL-1β) and anti-inflammatory cytokines (IL-10) in the THP-1 macrophage cell line. Statistically significant differences ($p < 0.05$) are represented with * when comparison was made versus TCP and with the symbol # when comparison was made versus Ti.

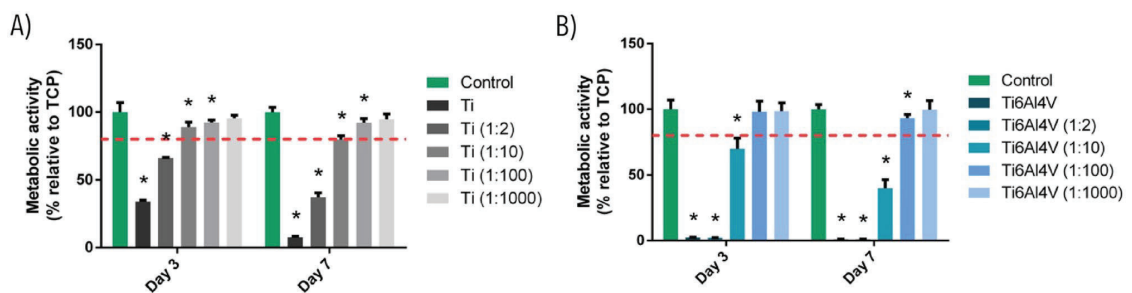


Figure 4. Effect of Ti (A) and Ti6Al4V (B) particles upon the metabolic activity of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) cultured for 3 and 7 days. Metabolic activity results were represented as percentage relative to an unstimulated control (TCP) and compared with the TCP of each day. Values < 80% metabolic activity (red line) which were significantly different ($p < 0.05$) from TCP were considered cytotoxic. Statistically significant differences ($p < 0.05$) are represented with *.

Alkaline phosphatase (ALP) activity assay. ALP activity was not significantly different when compared to the control osteogenic medium. The Ti6Al4V and Ti extracts showed no statistically significant differences, which indicates that these extracts had no detectable influence upon ALP protein expression and activity (Fig. 6).

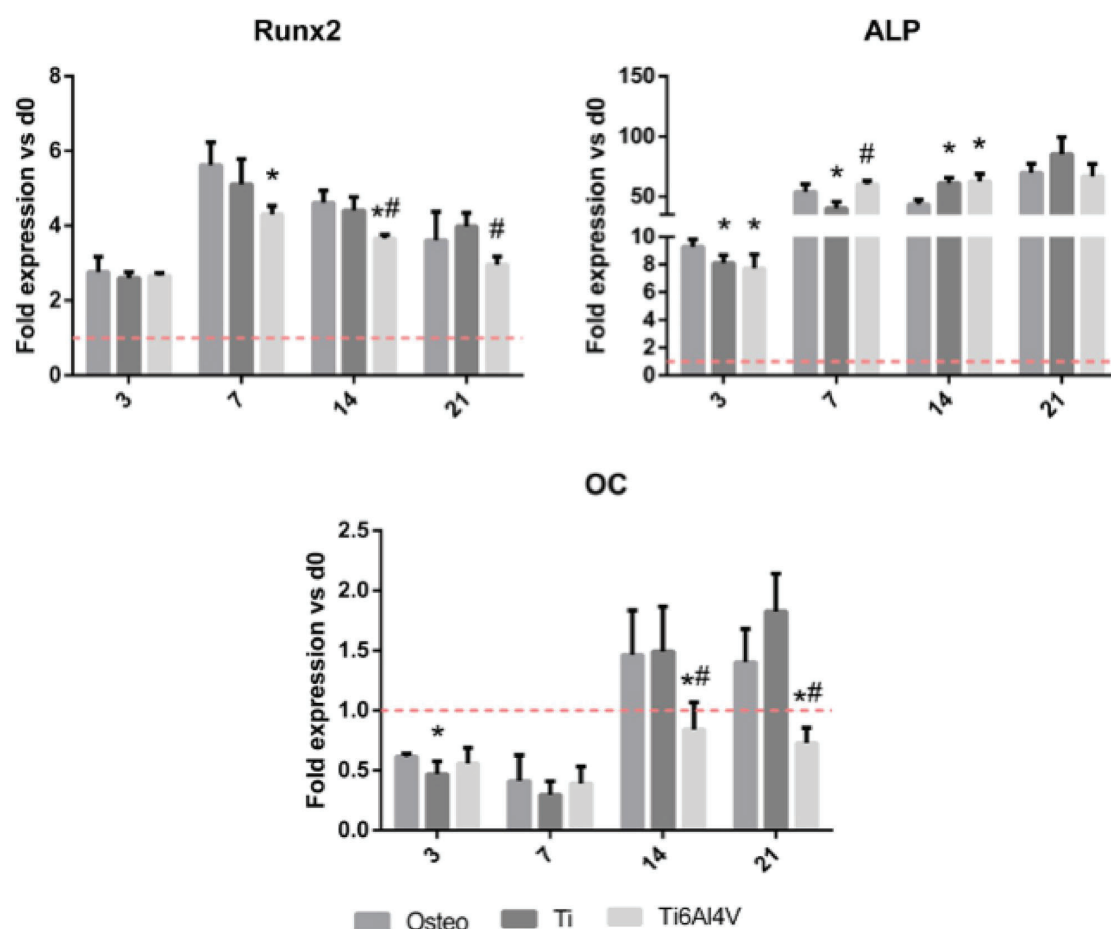


Figure 5. Effect of stimulation with Ti and Ti6Al4V alloy extracts upon gene expression of osteogenic markers Runx2, ALP and OC in cultured human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs). Statistically significant differences ($p < 0.05$) are represented with * when comparison was made versus osteogenic medium (Osteo) and with the symbol # when comparison was made versus Ti.

Discussion

In the present in vitro study, we evaluated the inflammatory and osteogenic response induced by Ti6Al4V particles released during implantoplasty and by as-received commercially pure Ti particles. To the best of our knowledge, this is the first paper to analyze the immunological effects induced by Ti6Al4V debris released during IP upon THP-1 and BM-MSCs. Our results suggest that both commercially pure Ti and Ti6Al4V particles may trigger an inflammatory response, because they can promote the expression and release of proinflammatory genes and cytokines. Moreover, Ti6Al4V extracts produced a significant decrease in the osteogenic markers Runx2 and OC in comparison with control osteogenic medium, but there was no effect on ALP activity.

Several limitations of the present study should be disclosed. Firstly, although this study followed ISO 10993-5 for the performance of cellular assays, due to the biological nature and complexity of the process of inflammation, future studies should assess the immunological response triggered by metal particles released during IP in an in vivo experimental scenario. Secondly, THP-1 cell line has limitations because it does not consistently behave as human macrophages³³. However, it must be pointed out that the genetic homogeneity of THP-1 minimizes the degree of variability in the cell phenotype, which facilitates reproducibility of findings^{33,34}. Finally, as grinding changes the properties of the metal and renders it more susceptible to corrosion³², using IP debris from commercially pure Ti implants could be interesting.

Titanium is a transitional element used in dental implantology and orthopedics due to its high biocompatibility, corrosion resistance and mechanical properties³⁵. The vast majority of osseointegrated dental implants are made of c.p. Ti or Ti alloys³⁶. Ti6Al4V alloy contains 6% of Al and 4% of V which differs from the composition of c.p. Ti³⁶. Both materials are considered bioinert due to the formation of a spontaneous oxide layer composed mainly of TiO₂ but which may incorporate other small contents of Al or V³⁷. This protective oxide layer can be

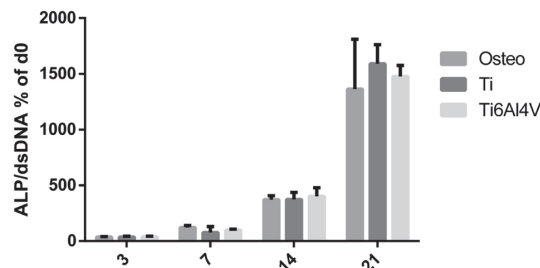


Figure 6. Effect of stimulation with Ti and Ti6Al4V alloy extracts upon ALP activity in cultured human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs). Statistically significant differences ($p < 0.05$) are represented with * when comparison was made versus TCP and with the symbol # when comparison was made versus Ti.

lost by corrosion³⁸, generating ions and nanoparticles that can remain in the peri-implant tissues or migrate systemically^{19,39}. Regarding Ti6Al4V alloys, a previous in vitro study showed that the metal particles of implantoplasty release higher concentration of V and Al ions compared to Ti ions³¹. Both ions have been associated with local adverse effects, neurotoxicity and negative cell viability response^{40–42}. In the present study, we used a dilution 1:100 because it allowed the viability of the used cells. To the best of authors' knowledge, there are no clinical studies in the literature describing the concentration of metal ions in the peri-implant tissues after implantoplasty⁴³. Therefore, future in vivo studies are needed to evaluate the effect of Ti, Al and V ion concentrations on peri-implant tissues.

Some concerns have been raised during the past few years regarding the role of Ti and metal particles in the development of aseptic osteolysis or “peri-implantitis” in dental implants^{1,26}. Therefore, we decided to conduct an in vitro analysis of the inflammatory and osteogenic response triggered by the metal debris released during IP. Firstly, we determined the cytotoxicity of each extract of Ti particles (Ti6Al4V and commercially pure Ti) in the THP-1 macrophage cell line at 24 h and 48 h. Titanium extracts reduced THP-1 cell viability at concentrations higher than 1:10 dilution, while in the case of Ti6Al4V extracts this phenomenon occurred at concentrations higher than 1:100 dilution (Fig. 1). This finding is consistent with the data from previous publications reporting that the release of Al and V ionic species may have a detrimental effect upon cells^{40,42,44}. On the other hand, both extracts (Ti6Al4V and commercially pure Ti) induced a proinflammatory response by promoting the polarization of macrophages towards M1 through the expression and release of proinflammatory genes and cytokines. We found some discrepancies between levels of mRNA and protein, which is a common finding in this type of cell culture assay^{45,46}. Eger et al.³⁰ reported that metal particles detached during the scaling of SLA dental implants were engulfed by macrophages and triggered a marked inflammatory response, with the release of IL-1 β , IL-6, TNF- α . These cytokines are also related to the activation of osteoclasts via the activation of RANKL expression, thereby inducing bone resorption^{17,37,47}.

Regarding osteogenic response, Ti extracts reduced the viability of the cultured BM-MSCs at concentrations > 1:10 dilution, while in the case of Ti6Al4V extracts this occurred at concentrations > 1:100 dilution (Fig. 4). Titanium particles can affect BM-MSC viability by inducing apoptosis through activation of the tumour suppressor proteins p53 and p73—this circumstance being dependent upon material composition, particle dosage and time⁴⁸. Once cytotoxicity was evaluated, we analysed gene expression and ALP activity of the BM-MSCs. Gene expression assays showed that the Ti6Al4V alloy could inhibit osteogenesis—its effects being particularly relevant in relation to the Runx2 and OC markers (Fig. 5), which are an early and late indicator, respectively, of osteogenic differentiation^{49,50}. On the other hand, we found no relevant differences regarding the activity of ALP (Fig. 6), an enzyme that releases inorganic phosphate, needed for the mineralization of bone tissue.

Some controversy has arisen regarding the use of antibiotic in in vitro cell culture studies⁵¹. The use of antibiotic can affect different aspects of the cells, such as cell metabolism or cell differentiation^{52,53}. In this line, Ryu et al.⁵¹ highlighted that penicillin–streptomycin antibiotic can alter gene expression in a human cell line. In contrast, antibiotics use has been recommended by standard cell culture protocols to maintain aseptic conditions and to reduce the risk of sample contamination⁵³. This fact is especially important in THP-1 cell line since these cells are sensible to bacteria and their metabolic products⁵⁴. Thus, we decided to use 1% penicillin–streptomycin in both cell culture to reduce bacterial contamination that could impact on macrophage polarization. Future studies should analyse the influence of not introducing an antibiotic in cell assays with metal particles.

In a way similar to the dental clinical scenario, metal particles are also generated in orthopedics, though in this case through friction of the joint surfaces. Such released metal debris can enter the cells via endocytosis and induce adverse biological effects, such as aseptic osteolysis^{55–58}. Obando-Pereda et al.⁵⁹ reported that these wear-generated particles triggered the expression of proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6. The release of these cytokines may also induce osteoclastogenesis and lead to aseptic loss of the joint prosthesis^{60,61}. We found that both Ti6Al4V particles generated by IP and commercially pure Ti particles activated the above-mentioned cytokines. Furthermore, Ti6Al4V particles decreased the expression of Runx2 and OC, which means that such metal debris may inhibit osteogenesis. Indeed, Runx2 plays a pivotal role in osteoblast differentiation

and in bone formation through transcriptional regulation of their target genes, while OC is involved in osteoblast activity and mineralization in the later stages of bone formation⁶².

Conclusions

Within the limitations of the present study, Ti6Al4V and c.p. Ti metal particles increased proinflammatory genes and cytokines. In turn, Ti6Al4V particles generated by implantoplasty reduced the expression of osteogenic markers. Animal and human studies are needed in order to confirm the possible role of Ti6Al4V and Ti particles in the development of bone resorption or peri-implant inflammation.

Methods

Titanium metal particles. In the present in-vitro study, use was made of a previously published protocol to collect metal particles released during IP of Ti6Al4V dental implants^{31,32}. In order to replicate the clinical procedure of IP, metal particles were collected from Ti grade V dental implants (Ti6Al4V) using a standardized procedure consisting of the sequential use of a fine-grained tungsten carbide bur and two silicon carbide polishers⁶³. The characterization of the material sample, including composition, granulometry, crystalline structure, morphology, ion release, nanoindentation and corrosion behaviour has been described in previous publications^{31,32}. On the other hand, a Ti powder, purchased from NanoShel (Chapel St., UK), was used as control in order to compare with inflammatory and osteogenic cell cultures with the tested Ti alloy IP particles (Ti6Al4V). This c.p. Ti has a powder size distribution that ranged from 30 to 70 nm, which was similar to the size of some metal particles released during implantoplasty³¹.

Sterilization of samples of Ti and collection of extracts. We separately sterilized IP debris (test) and c.p. Ti powder (control) with 96° ethanol. The latter was eliminated by three centrifugation cycles at 7200 rpm during 5 min and washing with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). After the last centrifugation, DPBS was discarded, and the required volume of cell culture medium was added in order to obtain a final concentration of 0.2 g of sample per ml of medium. Cell assays were performed by indirect culture with extracts according to section 8.2 of ISO 10993-5: after separation of metal particles and medium, we carried out the assays using this culture medium that had been previously exposed to metal particles.

Both samples (Ti6Al4V and c.p. Ti) were incubated for 72 h at 37 °C. In the case of the assays performed with the THP-1 macrophage cell line, the metal particles were incubated in supplemented Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium with L-glutamine and sodium bicarbonate (reference: r8758, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Fisher Scientific, Hampton, USA). On the other hand, in the assays with BM-MSCs we used the mesenchymal stem cell basal medium (reference: C-28013, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) supplemented with 125 pg/ml rh FGF basic, 15 ng/ml rh IGF-1, 7% FBS, 2.4 mM L-Alanyl-L-Glutamine (reference: PCS-500-041, ATCC, Manassas, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Fisher Scientific, Hampton, USA).

Cell culture and differentiation of THP-1 macrophage cell line. The THP-1 macrophage cell line was obtained from DSMZ (ACC 16) (Braunschweig, Germany) and the cell suspension culture was maintained at 3×10^5 cells/ml in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Fisher Scientific, Hampton, USA). Cells were cultured in a humidity-controlled incubator at 37 °C with 5% CO₂ supply. To enhance adhesion of the cells to the culture plates, we seeded them at a density of 3×10^4 cells/cm² in the presence of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) for 6 h. Then, the medium with PMA was removed, washed with DPBS, and the cells were exposed to the extracts previously obtained. In all assays, cells cultured with medium containing a concentration of 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) were used as a positive control for inflammation⁶⁴, and cells cultured without extract (tissue culture plate, TCP) were used as negative controls for inflammation.

Analysis of cytotoxicity in macrophage cell culture. An indirect contact cytotoxicity test was performed according to the guidelines specified in UNE EN ISO 10,993-5: "Biological evaluation of medical devices" part 5, entitled: "In vitro cytotoxicity tests". Cytotoxicity was calculated with the cell survival index, which indicates cytotoxicity at < 80%.

Cells were incubated for 24 and 48 h with different dilutions of the extract: undiluted and diluted extract 1:2, 1:10, 1:100 and 1:1000, using complete medium for the dilutions. We assessed cell adhesion and morphology by light microscopy before and after contact with the extracts. Once the assay was completed, we assessed cell viability through metabolic activity using resazurin sodium salt reagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Accordingly, we cultured cells in their medium with resazurin (10 µg/ml) for 3 h in the incubator at 37 °C and 5% CO₂. Then, we measured absorbance at 570 and 600 nm using a plate reader (Infinite 200 PRO, Tecan, Männedorf, Switzerland).

Macrophage gene expression analysis. Gene expression was analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). We analyzed proinflammatory markers (CCR7, TNF-α and IL-1β genes) and anti-inflammatory markers (CD206, TGF-β and IL-10 genes). In turn, RNA was isolated according to the recommendations of the manufacturer with the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), which included DNase treatment. Once extracted, we quantified RNA using a microplate reader (Take3, Bio-Tek, Winooski, USA). Then, we retrotranscribed RNA into cDNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit

		Gene	Forward (sequence 5'-3')	Reverse (sequence 5'-3')
Inflammation-associated genes	M1 (pro inflammatory)	TNF- α	TTCCAGACTTCCTTGAGA CACG	AAACATGTCTGAGCCAAG GC
		IL-1 β	GACACATGGGATAACGAG GC	ACGCAGGACAGGTACAGATT
		CCR7	GGCTGGTCGTGTGACCTAT	ACGTAGCGGTCAATGCTGAT
	M2 (anti-inflammatory)	IL-10	AAGCCTGACCACGCTTTCTA	ATGAAGTGGTTGGGGAAT GA
		TGF- β	TTGATGTCACCGAGTTG TG	TGATGTCCACTTGCACTGTG
		CD206	CCTGGAAAAAGCTGTGTG TCAC	AGTGGTGTGGCCCTTTTTCG
Osteogenesis-associated genes		Runx2	CCCGTGGCCTTCAAGGT	CGTTACCCGCCATGACAGTA
		ALP	GGAACCTCTGACCCCTTGA CC	TCCTGTTCACTCGTACTGC
		OC	CGCCTGGGTCTCTTCACTAC	CTCACACTCTCGCCCTATT
Housekeeping gene		β -actin	AGAGCTACGAGCTGCCTG AC	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

Table 1. List of primer sequences used for the gene expression analysis.

(Roche, Basel, Switzerland) according to the recommendations of the manufacturer. We used qPCR to detect gene expression with the QuantiNova SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany): 10 ng of cDNA was amplified by an initial activation step of two minutes at 95 °C, denaturation for 5 s at 95 °C, and 40 cycles of hybridization/extension for 10 s at 60 °C using the CFX96 Real-Time System (BioRad, Hercules, USA). Primers used to detect specific genes in the amplification are detailed in Table 1. We normalized gene expression to the mean cycle threshold (Ct) of the constitutive β -actin gene. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to compare mRNA expression between conditions, taking the cells cultured in tissue culture plate (TCP) value as reference.

Macrophage cytokine release analysis. After culturing the macrophages with the extracts for 24 and 48 h, we collected the supernatants to quantify the release of proinflammatory (TNF- α and IL-1 β) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines by macrophages into the culture medium. Quantification was performed using commercially available ELISA kits (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), following the recommendations of the manufacturer.

Cell culture and differentiation of in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs). The BM-MSCs were obtained from ATCC (PCS-500-012) and cultured in Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (ATCC; PCS-500-030) supplemented with 125 pg/ml rhFGF basic, 15 ng/ml rhIGF-1, 7% FBS, 2.4 mM L-alanyl-L-glutamine (ATCC; PCS-500-041) and 1% penicillin-streptomycin (Fisher Scientific, Hampton, USA). We kept the cell culture density at 3000 cells/cm². Subsequently, for cytotoxicity assay, BM-MSCs were seeded at a density of 9500 cells/cm², while for gene expression, alkaline phosphatase (ALP) activity and proliferation assays we seeded them at a density of 8000 cells/cm². In all assays, extracts were generated using osteogenic medium, which was composed of medium supplemented with 10 mM β -glycerophosphate, 50 μ g/ml ascorbic acid and 0.1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). As control, we used BM-MSCs exposed to osteogenic medium but without contact with the microparticles.

Analysis of cytotoxicity BM-MSCs culture. The BM-MSCs were exposed for 3 and 7 days to different dilutions of the extracts made using osteogenic medium: undiluted and diluted extract 1:2, 1:10, 1:100 and 1:1000. Metabolic activity was then analyzed by resazurin reduction assay. The BM-MSCs were incubated for 45 min at 37 °C in the presence of medium with a concentration of 50 μ g/ml of resazurin sodium salt. Resazurin reduction was quantified in the same manner as described in previous sections.

BM-MSCs gene expression analysis. Gene expression was analyzed at days 3, 7, 14 and 21 by RT-qPCR using the same protocol as that employed for the THP-1 gene expression assays. The genes analyzed were Runx2, alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OC). Primers used to amplify these genes are described in Table 1.

Alkaline phosphatase (ALP) activity assay. To quantify the ALP activity in the samples, we used a colorimetric method based on the conversion of p-nitrophenyl phosphate to p-nitrophenol in the presence of ALP. We lysed samples cultured with the extracts and with osteogenic medium with 200 μ l of 0.1% Triton X-100 in 1xTE buffer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), followed by three freeze-thaw cycles. Subsequently, 50 μ l of sample were combined with 50 μ l of a mixture in 1:1:1 ratios of 1.5 M 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 20 mM phosphatase substrate solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and 1 mM MgCl₂. The samples were incubated for 30 min at 37 °C, and we stopped the reaction using 1 M NaOH. The production of p-nitrophenol was quantified by measuring the absorbance at 405 nm and comparing it against a standard curve prepared with known concentrations of p-nitrophenol. Results were then normalized

to the results obtained in the proliferation assay. Cell proliferation was quantified by measuring the amount of dsDNA in the samples with the Quant-IT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Waltham, USA) following the recommendations of the manufacturer. We mixed 100 μ l of sample and 100 μ l of a 1:200 dilution of PicoGreen reagent in a black 96-well plate.

Statistical analysis. All assays were performed in triplicate, except for ALP activity, which was conducted in quadruplicate. Data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using MINITAB (version 18, Minitab Inc.). Nonparametric testing was used, for although the normal distribution of each dataset was confirmed by the Anderson–Darling normality test, homoscedasticity was ruled out (Barlett and Levene’s test for homogeneity of variances). Therefore, we used the Kruskal–Wallis test for multiple comparisons and the Mann–Whitney U-test for individual (one-to-one) comparisons. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

Data availability

The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE202419>.

Received: 23 April 2022; Accepted: 8 September 2022

Published online: 22 September 2022

References

- Schwarz, F., Derks, J., Monje, A. & Wang, H. L. Peri-implantitis. *J. Clin. Periodontol.* **45**, S267–S290 (2018).
- Schlee, M. *et al.* Treatment of periimplantitis with electrolytic cleaning versus mechanical and electrolytic cleaning: 18-month results from a randomized controlled clinical trial. *J. Clin. Med.* **10**, 3475 (2021).
- Suarez, F., Monje, A., Galindo-Moreno, P. & Wang, H. L. Implant surface detoxification: A comprehensive review. *Implant Dent.* **22**, 465–473 (2013).
- Figuerro, E., Graziani, F., Sanz, I., Herrera, D. & Sanz, M. Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontol.* **2000**(66), 255–273 (2014).
- Zipprich, H. *et al.* Comparison of decontamination efficacy of two electrolyte cleaning methods to diode laser, plasma, and air - abrasive devices. *Clin. Oral Investig.* **26**, 4549–4558 (2022).
- Gosau, M. *et al.* Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin. Oral Implants Res.* **21**, 866–872 (2010).
- Pranno, N. *et al.* Comparison of the effects of air-powder abrasion, chemical decontamination, or their combination in open-flap surface decontamination of implants failed for peri-implantitis : An ex vivo study. *Clin. Oral Investig.* **25**, 2667–2676 (2021).
- Kolonidis, S. G. *et al.* Osseointegration on implant surfaces previously contaminated with plaque. An experimental study in the dog. *Clin. Oral Implants Res.* **14**, 373–380 (2003).
- Alhag, M., Renvert, S., Polyzois, I. & Claffey, N. Re-osseointegration on rough implant surfaces previously coated with bacterial biofilm: An experimental study in the dog. *Clin. Oral Implants Res.* **19**, 182–187 (2008).
- Schwarz, F., Sahm, N., Iglhaut, G. & Becker, J. Impact of the method of surface debridement and decontamination on the clinical outcome following combined surgical therapy of peri-implantitis: a randomized controlled clinical study. *J. Clin. Periodontol.* **38**, 276–284 (2011).
- Schwarz, F., John, G., Mainusch, S., Sahm, N. & Becker, J. Combined surgical therapy of peri-implantitis evaluating two methods of surface debridement and decontamination. A two-year clinical follow up report. *J. Clin. Periodontol.* **39**, 789–797 (2012).
- Schwarz, F. *et al.* Combined surgical therapy of advanced peri-implantitis evaluating two methods of surface decontamination: A 7-year follow-up observation. *J. Clin. Periodontol.* **44**, 337–342 (2017).
- Berglundh, T. *et al.* Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *J. Clin. Periodontol.* **45**, S313–S318 (2018).
- Heitz-Mayfield, L. J. A. & Salvi, G. E. Peri-implant mucositis. *J. Periodontol.* **89**, S257–S266 (2018).
- Cadosch, D. *et al.* Biocorrosion and uptake of titanium by human osteoclasts. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **95**, 1004–1010 (2010).
- Fretwurst, T. *et al.* Is metal particle release associated with peri-implant bone destruction ? An Emerging concept. *J. Dent. Res.* **97**, 259–265 (2018).
- Pettersson, M. *et al.* Titanium ions form particles that activate and execute interleukin-1 β release from lipopolysaccharide-primed macrophages. *J. Periodontol. Res.* **52**, 21–32 (2017).
- Suárez-López del Amo, F., Garaicoa-Pazmiño, C., Fretwurst, T., Castilho, R. M. & Squarize, C. H. Dental implants-associated release of titanium particles: A systematic review. *Clin. Oral Implants Res.* **29**, 1085–1100 (2018).
- Olmedo, D. G., Nalli, G., Verdú, S., Paparella, M. L. & Cabrini, R. L. Exfoliative cytology and titanium dental implants: A pilot study. *J. Periodontol.* **84**, 78–83 (2013).
- Suárez-López del Amo, F. *et al.* Titanium activates the dna damage response pathway in oral epithelial cells: A pilot study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **32**, 1413–1420 (2017).
- Insua, A., Monje, A., Wang, H. L. & Miron, R. J. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **105**, 2075–2089 (2017).
- Garlet, G. P. & Giannobile, W. V. Macrophages: The bridge between inflammation resolution and tissue repair?. *J. Dent. Res.* **97**, 1079–1081 (2018).
- Wang, X., Li, Y., Feng, Y., Cheng, H. & Li, D. Macrophage polarization in aseptic bone resorption around dental implants induced by Ti particles in a murine model. *J. Periodontol. Res.* **54**, 329–338 (2019).
- Pajarinen, J. *et al.* The response of macrophages to titanium particles is determined by macrophage polarization. *Acta Biomater.* **9**, 9229–9240 (2013).
- Mandelin, J. *et al.* Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* **85**, 1196–1201 (2003).
- Albrektsson, T., Canullo, L., Cochran, D. & De Bruyn, H. “Peri-implantitis”: A complication of a foreign body or a man-made “disease”. Facts and fiction. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **18**, 840–849 (2016).
- Mombelli, A., Hashim, D. & Cionca, N. What is the impact of titanium particles and biocorrosion on implant survival and complications? A critical review. *Clin. Oral Implants Res.* **29**, 37–53 (2018).
- Kheder, W., Al Kawas, S., Khalaf, K. & Samsudin, A. R. Impact of tribocorrosion and titanium particles release on dental implant complications — A narrative review. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **57**, 182–189 (2021).

29. Noubissi, S., Scarano, A. & Gupta, S. A literature review study on atomic ions dissolution of titanium and its alloys in implant dentistry. *Materials (Basel)*. **12**, 368 (2019).
30. Eger, M., Sterer, N., Liron, T., Kohavi, D. & Gabet, Y. Scaling of titanium implants entrains inflammation-induced osteolysis. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
31. Toledano-Serrabona, J. *et al.* Physicochemical and biological characterization of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: An in vitro study. Part I. *Materials (Basel)* **14**, 6507 (2021).
32. Toledano-Serrabona, J. *et al.* Mechanical properties and corrosion behavior of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: An in vitro study. Part II. *Materials (Basel)* **14**, 6519 (2021).
33. Chanput, W., Mes, J. J. & Wichers, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* **23**, 37–45 (2014).
34. Bosshart, H. & Heinzlmann, M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann. Transl. Med.* **4**, 4–7 (2016).
35. Nicholson, W. Titanium alloys for dental implants: A review. *Prosthesis* **2**, 100–116 (2020).
36. Elias, C. N., Fernandes, D. J., De Souza, F. M., Monteiro, E. D. S. & De Biasi, R. S. Mechanical and clinical properties of titanium and titanium-based alloys (Ti G2, Ti G4 cold worked nanostructured and Ti G5) for biomedical applications. *J. Mater. Res. Technol.* **8**, 1060–1069 (2019).
37. Messous, R. *et al.* Cytotoxic effects of submicron- and nano-scale titanium debris released from dental implants: An integrative review. *Clin. Oral Investig.* **25**, 1627–1640 (2021).
38. Wilson, T. G. Bone loss around implants—is it metallosis?. *J. Periodontol.* **92**, 181–185 (2021).
39. Toledano-Serrabona, J. *et al.* Ion release and local effects of titanium metal particles from dental implants. An experimental study in rats. *J. Periodontol.* Epub ahead of print (2022).
40. Willis, J., Crean, S. J. & Barrak, E. N. Is titanium alloy Ti-6Al-4V cytotoxic to gingival fibroblasts — A systematic review. *Clin. Exp. Dent. Res.* **7**, 1–8 (2021).
41. Cordeiro, J. M. & Barão, V. A. R. Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants?. *Mater. Sci. Eng. C* **71**, 1201–1215 (2017).
42. Zwolak, I. Vanadium carcinogenic, immunotoxic and neurotoxic effects: A review of in vitro studies. *Toxicol. Mech. Methods* **24**, 1–12 (2014).
43. Noronha Oliveira, M. *et al.* Can degradation products released from dental implants affect peri-implant tissues?. *J. Periodontol. Res.* **53**, 1–11 (2018).
44. Challa, V. S. A. & Misra, R. D. K. Reduced toxicity and superior cellular response of preosteoblasts to Ti-6Al-7Nb alloy and comparison with Ti-6Al-4V. *J. Biomed. Mater. Res. A*. **101**, 2083–2089 (2013).
45. Dodo, C. G. *et al.* Pro-inflammatory analysis of macrophages in contact with titanium particles and porphyromonas gingivalis. *Braz. Dent. J.* **28**, 428–434 (2017).
46. Koussounadis, A., Langdon, S. P., Um, I. H., Harrison, D. J. & Smith, V. A. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci. Rep.* **5**, 1–9 (2015).
47. Eger, M. *et al.* Mechanism and prevention of titanium particle-induced inflammation and osteolysis. *Front. Immunol.* **9**, 2963 (2018).
48. Wang, M. L. *et al.* Direct and indirect induction of apoptosis in human mesenchymal stem cells in response to titanium particles. *J. Orthop. Res.* **21**, 697–707 (2003).
49. Gromolak, S. *et al.* Biological characteristics and osteogenic differentiation of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells stimulated with FGF-2 and BMP-2. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–22 (2020).
50. Loebel, C. *et al.* In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. *Tissue Eng. - Part A* **21**, 115–123 (2015).
51. Ryu, A. H., Eckalbar, W. L., Kreimer, A., Yosef, N. & Ahituv, N. Use antibiotics in cell culture with caution: Genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
52. Smith, R. P. *et al.* Genome-wide discovery of drug-dependent human liver regulatory elements. *PLoS Genet.* **10**, e1004648 (2014).
53. Llobet, L., Montoya, J., López-Gallardo, E. & Ruiz-Pesini, E. Side effects of culture media antibiotics on cell differentiation. *Tissue Eng. Part C. Methods* **21**, 1143–1147 (2015).
54. Vargas-Hernández, O. *et al.* THP-1 cells increase TNF- α production upon LPS + soluble human IgG co-stimulation supporting evidence for TLR4 and Fc γ receptors crosstalk. *Cell. Immunol.* **355**, 104146 (2020).
55. Gargioli, C. *et al.* Oxidative stress preconditioning of mouse perivascular myogenic progenitors selects a subpopulation of cells with a distinct survival advantage in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* **9**, 1 (2018).
56. Yao, J. J. *et al.* Local cellular responses to titanium dioxide from orthopedic implants. *Biores. Open Access* **6**, 94–103 (2017).
57. Haleem-Smith, H. *et al.* Biological responses of human mesenchymal stem cells to titanium wear debris particles. *J. Orthop. Res.* **30**, 853–863 (2012).
58. Okafor, C. C., Haleem-Smith, H., Laqueriere, P., Manner, P. A. & Tuan, R. S. Particulate endocytosis mediates biological responses of human mesenchymal stem cells to titanium wear debris. *J. Orthop. Res.* **24**, 461–473 (2006).
59. Obando-Pereda, G. A., Fischer, L. & Stach-Machado, D. R. Titanium and zirconia particle-induced pro-inflammatory gene expression in cultured macrophages and osteolysis, inflammatory hyperalgesia and edema in vivo. *Life Sci.* **97**, 96–106 (2014).
60. Masui, T., Sakano, S., Hasegawa, Y., Warashina, H. & Ishiguro, N. Expression of inflammatory cytokines, RANKL and OPG induced by titanium, cobalt-chromium and polyethylene particles. *Biomaterials* **26**, 1695–1702 (2005).
61. Xu, J. *et al.* NF- κ B modulators in osteolytic bone diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 7–17 (2009).
62. Makita, N. *et al.* Two of four alternatively spliced isoforms of RUNX2 control osteocalcin gene expression in human osteoblast cells. *Gene* **413**, 8–17 (2008).
63. Costa-Berenguer, X. *et al.* Effect of implantoplasty on fracture resistance and surface roughness of standard diameter dental implants. *Clin. Oral Implants Res.* **29**, 46–54 (2018).
64. Díez-Tercero, L., Delgado, L. M., Bosch-Rués, E. & Pérez, R. A. Evaluation of the immunomodulatory effects of cobalt, copper and magnesium ions in a pro inflammatory environment. *Sci. Rep.* **11**, 1–13 (2021).

Acknowledgements

We thank the CERCA Program, Generalitat de Catalunya, for institutional support.

Author contributions

J.T-S., F.J.G., C.G-E., M.A.S-G., conceived and designed the study; F.J.G., C.G-E., M.A.S-G., supervised the study; J.T-S., O.C-F., L.D-T., B.M.B., acquired and analyzed the data; O.C-F., J.T-S., M.A.S-G, E.V-C., performed the statistical analysis; J.T-S. L.D-T., B.M.B., E.V-C., M.A.S-G., interpreted the data and were involved in preparing the manuscript. All authors reviewed the final manuscript, approved the submitted version and agreed both to be personally accountable for the author's own contributions and to ensure that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated, resolved, and the resolution documented in the literature.

Funding

This study was supported by the *Instituto de Salud Carlos III* through project PI20/01596 (co-funded by the European Regional Development Fund [ERDF], a way to build Europe). The work was also supported by the Spanish Government and the Ministry of Science and Innovation of Spain by research projects RTI2018-098075-B-C21 and RTI2018-098075-B-C22 (co-funded by the European Regional Development Fund [ERDF], a way to build Europe).

Competing interests

Jorge Toledano-Serrabona, Leire Díez-Tercero and Begoña M. Bosch Bosch have received no grants, personal fees or non-financial support. F. Javier Gil reports grants from Ministry of Science and Innovation of Spain, during the conduct of the study. F. Javier Gil personal fees, and non-financial support from Klockner Dental Implants (Barcelona, Spain), outside the submitted work. Octavi Camps-Font reports grants from Instituto de Salud Carlos III during the conduct of the study. Octavi Camps-Font reports grants, personal fees and non-financial support from Avinent (Santpedor, Spain), outside the submitted work. Camps-Font has participated as co-investigator in clinical trials sponsored by Mundipharma (Cambridge, UK) and Menarini Recherche (Florence, Italy). Eduard Valmaseda-Castellón reports grants from Instituto de Salud Carlos III during the conduct of the study. Eduard Valmaseda-Castellón reports personal fees and non-financial support from MozoGrau (Valladolid, Spain). He has received personal fees from BioHorizons Ibérica (Madrid, Spain), Inibsa Dental (Llíça de Vall, Spain) and Dentsply implants Iberia (Barcelona, Spain) outside the submitted work. Valmaseda-Castellón is the Director of the Avinent-University of Barcelona research agreement (Càtedra UB-Avinent). In addition, Valmaseda-Castellón has participated as an investigator in clinical trials sponsored by Mundipharma (Cambridge, UK) and Geistlich (Wolhusen, Switzerland), outside the submitted work. Cosme Gay-Escoda reports grants from Instituto de Salud Carlos III during the conduct of the study. Cosme Gay-Escoda reports grants, personal fees, and non-financial support from Mundipharma (Cambridge, UK) and Menarini Recherche (Florence, Italy), outside the submitted work, outside the submitted work. M^a Ángeles Sánchez-Garcés reports grants from Instituto de Salud Carlos III during the conduct of the study. M^a Ángeles Sánchez-Garcés reports personal fees from Nobel Biocare (Göteborg, Sweden), Zimmer Biomet (Warsaw, USA) and Menarini Recherche (Florence, Italy), outside the submitted work.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.J.G., O.C.-F. or E.V.-C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Estudio 4:

Liberación de iones y efectos locales de las partículas metálicas de titanio de los implantes dentales. Un estudio experimental en ratas.

- **Autores:** Toledano-Serrabona J, Camps-Font O, de Moraes DP, Corte-Rodríguez M, Montes-Bayón M, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ.
 - **Título:** Ion release and local effects of titanium metal particles from dental implants. An experimental study in rats.
 - **Revista:** Journal of Periodontology
 - **Factor de impacto (2021):** 4.494
 - **Posición JCR (Dentistry, Oral Surgery & Medicine):** 12/92 (Primer cuartil)
 - **Referencia completa:** Toledano-Serrabona J, Camps-Font O, de Moraes DP, Corte-Rodríguez M, Montes-Bayón M, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ. Ion release and local effects of titanium metal particles from dental implants. An experimental study in rats. J Periodontol. 2022: Epub ahead of print.
 - **DOI:** 10.1002/JPER.22-0091
-

Objetivo

Determinar la reacción tisular y la translocación de iones metálicos a sangre y a órganos a distancia inducidas por la acumulación de partículas de Ti en aleación en un defecto mandibular.

Material y Método

Modelo animal

El presente estudio siguió las directrices ARRIVE para la ejecución de estudios con animales (337), y fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universitat de Barcelona (CEEa-UB) (España), con el número de identificación 10799.

Se diseñó un estudio experimental aleatorio en 20 ratas Sprague-Dawley. Se incluyeron ratas adultas machos y hembras (proporción 1:1) ex-reproductivas, de 6 - 8 meses de edad y con un peso de 380 - 450 g. Todos los animales se estabularon en condiciones estándar de ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, a una temperatura ambiente de 22 ± 2 °C y una humedad relativa del 50 ± 10 %.

Cálculo del tamaño de la muestra

Para comparar la intervención con una referencia (338), el tamaño de la muestra se calculó mediante una prueba t bilateral para grupos independientes con una potencia del 90 % y un error alfa del 5 %, empleando un tamaño del efecto de 1.05 y una desviación típica (DT) común de 0.62. Se añadieron dos ratas al grupo experimental para compensar posibles pérdidas. A continuación, las ratas fueron asignadas aleatoriamente a uno de los tres grupos: un grupo experimental (10 ratas con un defecto mandibular unilateral relleno de partículas metálicas); un grupo control positivo

(8 ratas con un defecto mandibular unilateral vacío); y un grupo control negativo (2 ratas sin defecto mandibular).

Aleatorización y ocultación

Se generó una tabla de números aleatorios utilizando Stata14 (StataCorp®, College Station, EE.UU.) para la asignación aleatoria. Para garantizar la ocultación de la asignación al cirujano, un investigador independiente (O.C-F.) asignó las ratas utilizando sobres cerrados, opacos y numerados. Como las ratas de control negativo no se sometieron a la cirugía, sus sobres estaban etiquetados en el exterior. Los sobres se abrieron secuencialmente justo después de realizar los defectos óseos mandibulares.

Preparación de las partículas metálicas

Se recogieron las partículas metálicas desprendidas durante la implantoplastia de implantes dentales de Ti6Al4V (Avinent Implant System S.L., Santpedor, España). Los autores siguieron un protocolo estandarizado de implantoplastia empleado en humanos y descrito previamente por Costa-Berenguer y cols. (257). Para estandarizar el procedimiento, todas las implantoplastias se llevaron a cabo por un único investigador (J.T-S.). La implantoplastia se hizo para eliminar las roscas de la mitad coronal de implantes dentales de 4.8x13 mm (Coral E.C., Avinent Implant System S.L., Santpedor, España). La superficie del implante se modificó secuencialmente con una fresa de carburo de tungsteno de grano fino (H379.314. 014 KOMET; GmbH & Co. KG, Lemgo, Alemania) y dos pulidores de carburo de silicio (9608.314.030 KOMET y 9618.314.030 KOMET; GmbH & Co. KG, Lemgo, Alemania).

Protocolo quirúrgico

El procedimiento quirúrgico se realizó por un único investigador experimentado (M.Á.S-G.). Para la inducción anestésica se utilizó isoflurano al 5 % (Forane®, Laboratorios Abbott, Madrid, España) y un flujo continuo de oxígeno de 5 L/min inhalado en una cámara anestésica. Se administró buprenorfina (Buprex®, RB Pharmaceuticals Ltd., Slough, Berkshire, Reino Unido) a una dosis de 0.1 mg/kg por vía subcutánea. También se administró una dosis única de enrofloxacin de 10 mg/kg (Baytril®, Bayer Hispania, Barcelona, España) como profilaxis antibiótica. Los animales se conectaron a un respirador (New Generation Black Mk-TCIII, NSS, Reino Unido) para el mantenimiento anestésico con un flujo de oxígeno de 0.7-0.8 L/min e isoflurano vaporizado al 2 - 2.5 % a 3.5 L/min. Además, se infiltró 1 mL de articaína al 4 % con adrenalina 1:100.000 (Ultracain®, Laboratorios Normon, Tres Cantos, Madrid, España) en la zona mandibular.

Después de comprobar la profundidad de la anestesia, se desinfectó la zona quirúrgica con povidona yodada tópica al 10 % (Iodine®, Laboratorios Reig Jofré, Sant Joan Despí, Barcelona, España) y se preparó el campo quirúrgico. La cola de la rata se sumergió en agua caliente durante 10 minutos y, tras aplicar etanol al 70 %, se recogió 1.5 mL de sangre a partir de una incisión en la cola (339). A continuación, se inmovilizaron los animales mediante un sistema de retracción con fijador magnético (Fine Science Tools, Foster City, EE.UU.) (340). Se hizo una incisión cutánea submandibular en dirección anteroposterior y de 1.5 cm de longitud. Tras exponer el borde inferior de la mandíbula mediante una disección roma, se creó un defecto óseo rectangular estandarizado (6 x 2 mm) siguiendo un modelo descrito previamente (341). La ostectomía se llevó a cabo con una fresa redonda a 2000 r.p.m. y bajo irrigación constante con suero salino estéril. Inmediatamente después de realizar los defectos óseos mandibulares, se abrieron los sobres con la asignación. En el grupo experimental, los defectos óseos se rellenaron con partículas metálicas hasta la parte

superior del defecto. Se introdujeron en el defecto partículas metálicas recogidas mediante implantoplastia de la mitad coronal de un implante dental de 4.8 x 13 mm (Coral E.C., Avinent Implant System S.L., Santpedor, España). Los defectos de los controles positivos se dejaron vacíos. La herida se suturó con Vicryl 4-0 (Laboratorios Aragó, Barcelona, España). La Figura 43 muestra las distintas fases quirúrgicas.

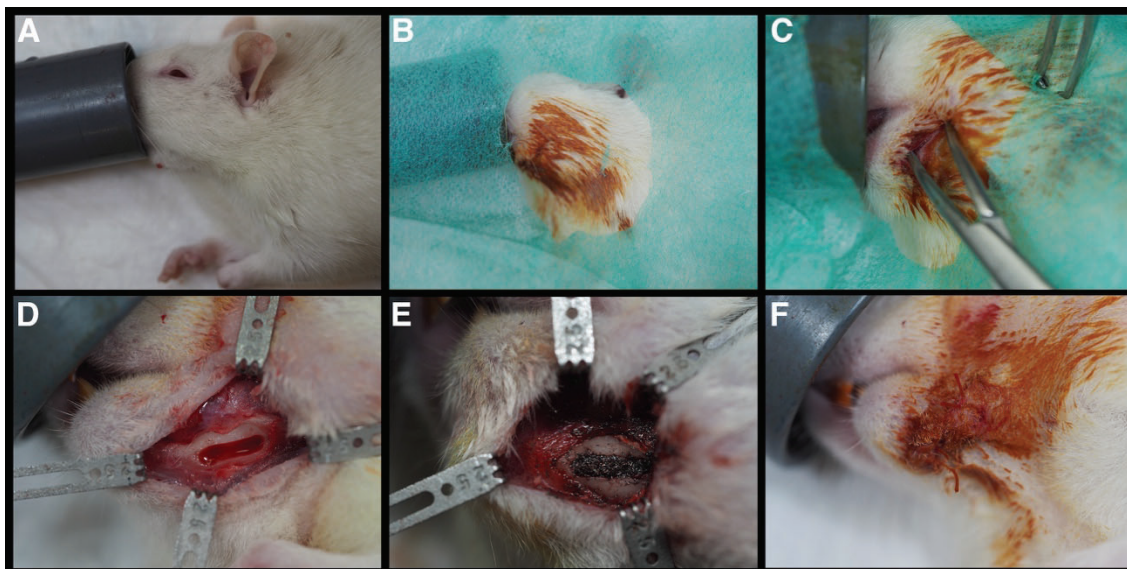


Figura 43. Procedimiento quirúrgico. Anestesia inhalatoria (A), desinfección de la zona quirúrgica (B), incisión y disección (C), defecto óseo mandibular (D), relleno del defecto con partículas metálicas (E) y sutura (F).

Durante los dos primeros días postoperatorios, se administró meloxicam 2 mg/kg (Metacam®, Boehringer Ingelheim, Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España) por vía subcutánea cada 24 horas.

Treinta días después de la cirugía, se practicó la eutanasia de los animales por inhalación de una atmósfera saturada de CO₂. Antes de la eutanasia, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano al 5 % como se ha descrito anteriormente y se repitió el mismo procedimiento para extraer 1.5 mL de sangre de la cola.

Recogida y procesado de las muestras

El tejido perilesional obtenido por disección del sitio quirúrgico se fijó inmediatamente con formaldehído en solución acuosa al 10 % (número de pedido HT501128-4L, Sigma-Aldrich, Sant Louis, EE.UU.). La sangre, el hígado, el bazo, el cerebro y ambos pulmones fueron extraídos y congelados a -80 °C para su posterior liofilización.

La liofilización es un proceso cuyo objetivo es separar el agua (o algún otro disolvente) de una solución mediante la congelación y sublimación del hielo a presión reducida. Este procedimiento es el mejor método para secar compuestos orgánicos sin alterar su composición cualitativa o cuantitativa.

Cuantificación de los iones metálicos

El análisis cuantitativo de los iones metálicos de Ti, Al y V en la sangre y los órganos se llevó a cabo por investigadores que desconocían la asignación de cada muestra.

- Instrumentación

Las digestiones asistidas por microondas se llevaron a cabo en un sistema Ethos 1 de Milestone (Sorisole, Italia) equipado con micro-insertos de TFM para un menor consumo y dilución de la muestra. Las mediciones mediante el equipo de ICP-MS se llevaron a cabo en un instrumento iCAP TQ de triple cuadrupolo de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EE.UU.). El TQ-ICP-MS estaba equipado con un nebulizador Micromist, una cámara de pulverización ciclónica y conos de muestreo y extracción de cobre/níquel. Las muestras, los reactivos de las digestiones y las diluciones finales se pesaron en una balanza analítica (Mettler Toledo, Ohio, EE.UU.) con una precisión de ± 0.1 mg.

- Reactivos

Se utilizó agua ultrapura ($<18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtenida de un sistema PURELAB flex 3 (ELGA VEOLIA, Lane End, Reino Unido) para todas las soluciones y normas de trabajo. El ácido nítrico concentrado (HNO_3) de grado analítico se adquirió en Thermo Fisher Scientific y se purificó mediante destilación por sub-ebullición. La solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 % se obtuvo de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.). El ácido fluorhídrico al 99.99 % (pureza en base metálica) de Alfa Aesar se adquirió en Fisher Scientific (Hampton, EE.UU.).

La contaminación de los reactivos y los recipientes utilizados para la digestión de los tejidos se redujo al mínimo mediante una cuidadosa manipulación. Al principio, no se utilizó peróxido de hidrógeno, ya que no aportó ninguna mejora significativa en las recuperaciones y la RSD (desviación típica relativa) de las repeticiones fue mayor. La purificación del ácido nítrico concentrado mediante destilación por sub-ebullición se llevó a cabo en la configuración LO (tasa de destilación más baja) y se implementó un protocolo de limpieza inicial utilizando una doble destilación de agua ultrapura. Además, se desecharon los primeros 500 mL del agua Milli-Q utilizada para la dilución de los estándares y las muestras. La limpieza de los contenedores de polipropileno (utilizados para la dilución de las muestras antes de su análisis por ICP-MS) con ácido nítrico al 1 % se realizó durante la noche. Estos contenedores se enjuagaron con agua Milli-Q antes de la preparación de las muestras.

- Digestión por microondas

Las muestras liofilizadas se trituraron con un mortero de ágata y se introdujeron 0.1 g de cada muestra en los insertos de digestión de microondas. Primero se añadieron 25 μL de ácido fluorhídrico (HF) y se dejaron reaccionar con el polvo de la muestra durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 2 mL de HNO_3 y las muestras se

sometieron al programa de microondas indicado en la Tabla 14 para la digestión de las muestras. Finalmente, las muestras digeridas se diluyeron 10 veces en HNO₃ al 2 % (338,342).

Debido a la naturaleza más compleja de la matriz en las muestras de sangre, se incubaron 0.1 g de sangre liofilizada con 25 µL de HF y 2 mL de HNO₃ durante una hora a temperatura ambiente antes de aplicar el programa de digestión modificado en el microondas, como se muestra en la Tabla 14. El uso de recipientes nuevos, especialmente diseñados para micromuestras, pretendía minimizar la contaminación externa. Entre muestra y muestra, los insertos se limpiaron utilizando 2 mL de HNO₃ al 50 % (v/v) y 25 µL de HF concentrado.

El programa de temperaturas de MW para la limpieza se llevó a cabo mediante una rampa de 10 minutos hasta 150 °C, 10 minutos de mantenimiento a 150 °C (potencia de MW de 900 W en ambos pasos) y un paso de enfriamiento durante 60 minutos hasta la temperatura ambiente. A continuación, los insertos se enjuagaron con agua ultrapura y se secaron antes de la siguiente operación.

Tabla 14. Programa de microondas empleado para la digestión de las muestras.

	Para los órganos	Para la sangre
Paso 1	10 minutos de temperatura ambiente a 90 °C	15 minutos de temperatura ambiente a 90°C
Paso 2	6 minutos de 90 a 140 °C	15 minutos de 90 a 140 °C
Paso 3	5 minutos de 140 a 200 °C	15 minutos de 140 a 200 °C
Paso 4	10 minutos a 200 °C	10 minutos a 200 °C
Paso 5	1 hora de enfriamiento a temperatura ambiente	1 hora de enfriamiento a temperatura ambiente

- Mediciones ICP-MS

El Ti se midió en el TQ-ICP-MS monitorizando el isótopo ⁴⁷Ti⁺ para evitar la interferencia del isótopo de larga vida media ⁴⁸Ca⁺ en el isótopo más abundante ⁴⁸Ti⁺. El análisis se llevó a cabo en modo de triple cuadrupolo (TQ) utilizando oxígeno en el segundo cuadrupolo para formar ⁴⁷Ti¹⁶O⁺, que se monitoriza en el m/z 63. El V también se midió como su óxido más abundante, ⁵¹V¹⁶O⁺, en modo TQ-O₂, a m/z 67. El Al se

midirá en modo cuadrupolo único (SQ) como $^{27}\text{Al}^+$. Todos los análisis se cuantificaron mediante calibración externa y el escandio se utilizó como estándar interno. El tiempo de medición de la muestra fue de 2 minutos por muestra y la curva de calibración se preparó para el Ti, el Al y el V con estándares de 0, 0.25, 0.50, 1, 2.5 y 5 ng/g (soluciones preparadas por peso). El límite de detección instrumental estimado como 3σ (blancos)/pendiente de la curva de calibración fue de 0.007 ng/mL de Ti, 0.158 ng/mL de Al y 0.002 ng/mL de V. La sensibilidad (pendiente de la curva de calibración) para el Ti fue de 69 000 cps/ppb ($r^2 = 0.9992$), que es extremadamente baja. Sin embargo, teniendo en cuenta las diluciones realizadas en las muestras, esto se tradujo en 1.75, 39 y 0.51 ng/g de tejido para Ti, Al y V, respectivamente. La medición de cada muestra preparada se hizo por triplicado y para cada órgano se preparó un duplicado de la digestión. La reproducibilidad dentro de las réplicas de las mediciones estuvo entre el 2 - 3 % en todos los casos y entre las réplicas del procedimiento (incluyendo la digestión) por debajo del 15 % para los tres elementos.

Análisis histológico

El análisis histológico del tejido perilesional de la zona quirúrgica se llevó a cabo por un anatomopatólogo experimentado (S.B.). El tejido se fijó en formalina neutra tamponada al 10 % y se embebió en parafina tras la descalcificación (343). A continuación, los bloques de parafina se seccionaron utilizando un micrótopo rotatorio Microm HM 340 E (Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Alemania) hasta alcanzar un grosor de 5 μm . Para estudiar las muestras se utilizó una tinción con hematoxilina-eosina (HE).

Se utilizó un microscopio de luz (CX31, Olympus, Tokio, Japón) para estudiar las muestras histológicas. Además, se empleó un microscopio Leica DMD 108 (Leica Company, Wetzlar, Alemania) para obtener microfotografías.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se introdujeron en una hoja de Microsoft Excel (Microsoft®, Redmond, Washington, EE.UU.) y posteriormente se procesaron con el software Stata 14 (StataCorp®, College Station, EE.UU.).

Para el análisis descriptivo, se calculó la mediana y el rango intercuartílico (IQR). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, mientras que los cambios intra-sujetos se detectaron mediante la prueba de Wilcoxon. Respecto al análisis de los iones metálicos, se detectaron valores atípicos extremos (definidos como valores por encima del percentil 75 y tres veces el IQR). Se implementó el análisis estadístico con y sin estos valores atípicos. Finalmente, los datos se presentaron sin valores atípicos. En todos los casos, el nivel de significación requerido fue de $p \leq 0.05$.

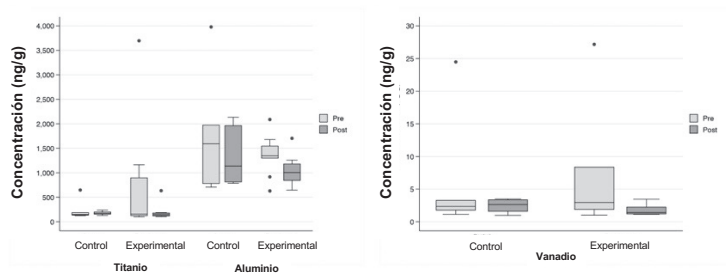
Resultados

De las 20 ratas intervenidas quirúrgicamente, una del grupo control positivo falleció durante las primeras 24 horas del postoperatorio. Por lo tanto, se llevó a cabo el análisis histológico y la cuantificación de iones de las muestras correspondientes a 10 ratas del grupo experimental, siete ratas del grupo control positivo y dos ratas del grupo control negativo.

Cuantificación de iones metálicos

La distribución de las concentraciones de iones metálicos en la sangre y los órganos se muestra en la Figura 44. Las Tablas 15 y 16 muestran la concentración de iones metálicos en sangre y órganos, respectivamente. Estos datos se presentaron sin los valores atípicos.

A) Sangre



B) Órganos

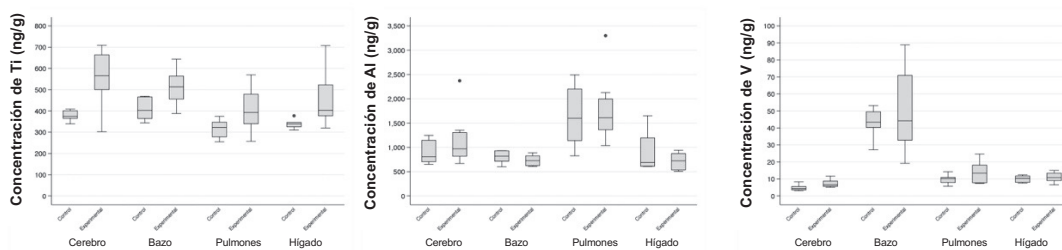


Figura 44. Diagramas de caja de la concentración de Ti, Al y V en sangre (A) y órganos (B).

- Sangre

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en términos de concentraciones de iones Ti, Al o V. Sin embargo, en el grupo experimental la concentración de Al fue significativamente menor en la muestra post-intervención en comparación con la muestra pre-intervención (Tabla 15).

Las dos ratas del grupo de control negativo (no operadas) mostraron las siguientes concentraciones de iones metálicos en la pre-intervención: rango [Ti] = 160.5 - 371.3 ng/g; rango [Al] = 747.9 - 758.3 ng/g; rango [V] = 4.12 - 14.6 ng/g, mientras que las concentraciones posteriores a la intervención fueron: rango [Ti] = 149.6 - 165.4 ng/g; rango [Al] = 689.0 - 1149.5 ng/g; rango [V] = 4.9 - 5.3 ng/g.

Tabla 15. Resultados de la cuantificación de iones en sangre. Datos expresados con la mediana (IQR).

Grupos de estudio		Comparación entre grupos		Comparación intragrupo	
Cuantificación de iones	Experimental	Control positivo	p-valor grupo experimental vs. grupo control	p-valor grupo experimental previo a la intervención vs. posterior a la intervención	p-valor grupo control previo a la intervención vs. posterior a la intervención
Sangre, ng/g					
Previo a la cirugía					
Titanio (n=17)	157.9 (769.3)	148.05 (50.3)	0.939		
Aluminio (n=18)	1347.9 (245.9)	1593.7 (1192.1)	0.9854		
Vanadio (n=16)	2.95 (6.47)	2.36 (1.5)	0.755		
Posterior a la cirugía					
Titanio (n=17)	145.4 (59.3)	165.6 (44.4)	0.746	0.161	0.600
Aluminio (n=18)	1004.5 (334.9)	1138.3 (1149.8)	0.731	0.028*	0.735
Vanadio (n=16)	1.43 (1.05)	2.64 (1.75)	0.682	0.063	0.917

NA: no aplicable; *: estadísticamente significativo ($p < 0.05$)

- Tejidos viscerales

Las concentraciones de iones Ti en el cerebro ($p = 0.010$), el bazo ($p = 0.037$) y el hígado ($p = 0.014$) fueron significativamente mayores en el grupo experimental que en los controles positivos (Tabla 16). Además, también hubo una mayor concentración de iones V en el cerebro de las ratas experimentales ($p = 0.016$; Tabla 16). No hubo diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de iones Al (Tabla 16).

Las concentraciones de iones metálicos se indican entre paréntesis para las dos ratas del grupo de control negativo en cerebro (rango [Ti] = 420.4 - 497.0 ng/g; rango [Al] = 1254.5 - 1858.6 ng/g; rango [V] = 5.7 - 7.2 ng/g), bazo (rango [Ti] = 421.9 - 447.1 ng/g; rango [Al] = 1113.6 - 1133.7 ng/g; rango [V] = 37.3 - 55.0 ng/g), pulmones (rango [Ti] = 291.4 - 318.7 ng/g; rango [Al] = 1555.2 - 2203.6 ng/g; rango [V] = 8.4 - 11.0 ng/g) e

hígado (rango [Ti] =374.1 - 493.7 ng/g; rango [Al] =751.0 - 1160.6 ng/g; rango [V] = 9.4 - 10.4 ng/g).

Tabla 16. Resultados de la cuantificación de iones en órganos. Datos expresados con la mediana (IQR).

Cuantificación de iones	Grupos de estudio		Comparación entre grupos
	Experimental	Control positivo	p-valor experimental versus grupo control
Órganos, ng/g			
Cerebro			
Titanio (n=19)	565.6 (163.2)	374.6 (35.6)	0.010*
Aluminio (n=19)	971.1 (487.3)	806.6 (440.5)	0.512
Vanadio (n=19)	6.5 (3.1)	4.3 (2.0)	0.016*
Bazo			
Titanio (n=19)	513.3 (108.2)	402.5 (100.9)	0.037*
Aluminio (n= 17)	726.0 (201.5)	819.9 (214.6)	0.721
Vanadio (n=18)	44.2 (38.1)	43.4 (9.2)	0.988
Pulmones			
Titanio (n=18)	392.7 (138.8)	322.3 (69.0)	0.135
Aluminio (n=18)	1610.2 (633.9)	1599.7 (1060.8)	0.988
Vanadio (n=18)	13.4 (10.4)	10.2 (3.0)	0.632
Hígado			
Titanio (n=18)	402.8 (145)	338.7 (20.4)	0.014*
Aluminio (n=19)	723.5 (337.2)	689.3 (584.5)	0.978
Vanadio (n=19)	10.8 (4.4)	10.3 (3.8)	0.940

IQR: rango intercuartílico; *: estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Muestras histológicas

En todas las muestras histológicas se pudo observar una mucosa revestida de epitelio escamoso, submucosa, músculo esquelético, glándulas salivales accesorias, hueso alveolar y dientes.

En el grupo experimental, las partículas metálicas estaban presentes como depósitos negros de contorno irregular y birrefringentes bajo luz polarizada. Como se muestra en la Figura 45, hubo una reacción granulomatosa con presencia de histiocitos y células gigantes multinucleadas (MNGCs) alrededor de las partículas metálicas. Se encontraron pequeñas partículas metálicas dentro del citoplasma de las MNGCs.

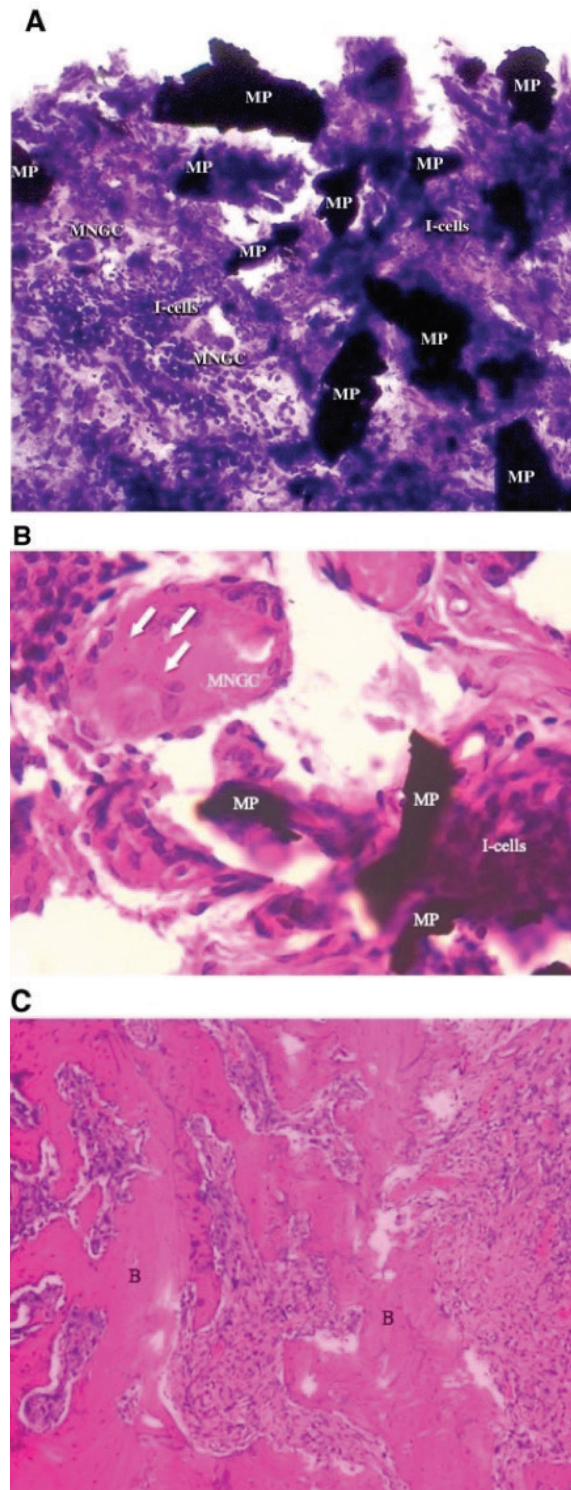


Figura 45. Reacción granulomatosa con presencia de histiocitos y células gigantes multinucleadas alrededor de las partículas metálicas. MNGCs: células gigantes multinucleadas; MP: partícula metálica; células I: células inflamatorias. Tinción de hematoxilina-eosina y aumento $\times 20$ (A). Pequeñas partículas metálicas en el citoplasma de las células gigantes multinucleadas (flechas). MNGCs: células gigantes multinucleadas; MP: partícula metálica; células I: células inflamatorias. Tinción de hematoxilina-eosina y aumento $\times 63$ (B). Hueso maduro desordenado con líneas de osificación irregulares correspondientes a un callo óseo de fractura. B: hueso. Tinción de hematoxilina-eosina y aumento $\times 10$ (C).

Artículo original



ORIGINAL ARTICLE

Ion release and local effects of titanium metal particles from dental implants: An experimental study in rats

Jorge Toledano-Serrabona^{1,2} | Octavi Camps-Font^{1,2} | Diogo Pompéu de Moraes^{3,4,5} | Mario Corte-Rodríguez^{3,4} | María Montes-Bayón^{3,4} | Eduard Valmaseda-Castellón^{1,2} | Cosme Gay-Escoda^{1,2} | M. Ángeles Sánchez-Garcés^{1,2}

¹Department of Oral Surgery and Implantology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain
(Email: ocamps@ub.edu; eduardvalmaseda@ub.edu; cgay@ub.edu; masanchezg@ub.edu)

²Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain

³Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Oviedo, Spain
(Email: diogo.moraes@ufpr.br; cortemario.uo@uniovi.es; montesmaria@uniovi.es)

⁴Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain

⁵Institute of Chemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Correspondence

Jorge Toledano-Serrabona, School of Medicine and Health Sciences, Campus de Bellvitge, University of Barcelona, C/ Feixa Llarga s/n; Pavelló Govern, 2^a planta, Despatx 2.9, 08907 – L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona), Spain.
Email: jorgetoledano25@gmail.com

Abstract

Background: The objective of this study was to evaluate the accumulation of ions in blood and organs caused by titanium (Ti) metal particles in a mandibular defect in rats, together with a description of the local reaction of oral tissues to this Ti alloy debris.

Methods: Twenty Sprague-Dawley rats were randomly distributed into three groups: an experimental group with a mandibular bone defect filled with metallic debris obtained by implantoplasty; a positive control group; and a negative control group. Thirty days after surgery, the rats were euthanized and perilesional tissue surrounding the mandibular defect was removed, together with the lungs, spleen, liver, and brain. Two blood samples were collected: immediately before surgery and before euthanasia. The perilesional tissue was histologically analyzed using hematoxylin-eosin staining, and Ti, aluminum, and vanadium ion concentrations in blood and organs were measured by TQ-ICP-MS. Descriptive and bivariate analyses of the data were performed.

Results: All rats with implanted metal debris showed metal particles and a bone fracture callus on the osseous defect. The metal particles were surrounded by a foreign body reaction characterized by the presence of histiocytes and multinucleated giant cells (MNGCs). The experimental group had a significant higher concentration of Ti ions in all studied organs except lung tissue ($p < 0.05$). In addition, there were more V ions in the brain in the experimental group ($p = 0.008$).

Conclusions: Although further studies are required to confirm the clinical relevance of these results, Ti metal particles in the jaw might increase the concentration of metal ions in vital organs and induce a foreign body reaction.

KEYWORDS

implantoplasty, ion release, metal particles, peri-implantitis, Ti6Al4V, titanium



1 | INTRODUCTION

Commercially pure titanium (Ti) or Ti alloys are the most commonly used metallic materials in dental implants.¹ Despite implants have proven to be a successful treatment to restore function and esthetics in edentulous patients,² the increasing number of peri-implant diseases has become a growing concern in implant dentistry.³

Although it is well documented that peri-implantitis is an inflammatory condition caused by bacterial plaque,⁴ there are other factors such as Ti metal particles that have been suggested as a contributor factor.^{5,6} Ti-based implants are biocompatible due to formation of a protective Ti oxide layer. This stable passive film protects the surface of the dental implant from corrosion.^{7,8} However, an acid environment or implant polishing can reduce the corrosion resistance of the material until the loss of the Ti oxide layer.^{8,9} This fact facilitates the release of nanodebris and soluble metal ions that might induce adverse tissue reactions.¹⁰

The presence of nanoparticulated metal debris in the peri-implant tissues has been previously described.¹¹ In addition, the presence of molecules, such as citrate or tartrate in biological fluids might also generate “soluble” forms of Ti (Ti-citrate or Ti-tartrate).¹² Therefore, ions and particles are two different forms of Ti that coexist in the peri-implant environment. Likewise, the effects of the release of these metal ions and nanoparticles into the medium are still unknown.^{5,13,14} On the other hand, the interaction between Ti metal particles and peri-implant tissues still raises controversy.¹⁵ Albrektsson et al.¹⁶ suggested that this metal debris triggers a foreign body reaction, while others^{17,18} reported that Ti particles induce a pro-inflammatory response.

The primary objective of this experimental animal study was to determine whether accumulation of Ti metal particles from dental implants in mandibular bone defects of rats results in a significant translocation and accumulation of Ti, aluminum (Al) and vanadium (V) ions in blood, liver, spleen and brain. The secondary objective was to analyze the response of perilesional bone and mucosal tissue to the presence of such Ti metal particles.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animal model

The present study followed the ARRIVE guidelines for conducting animal studies,¹⁹ and was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Barcelona (CEEA-UB) (Spain), under identification number 10799.

A randomized experimental study was carried out in 20 Sprague-Dawley rats. Adult male and female (proportion 1:1) ex-reproductive rats aged 6–8 months and with a weight of 380–450 g were included in the study. All animals were housed under standard conditions of 12-h light-dark cycles at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and a relative humidity of $50\% \pm 10\%$.

2.2 | Sample size calculation

In order to compare the intervention with a reference,²⁰ the sample size was calculated using a bilateral *t*-test for independent groups with a power of 90% and an alpha error of 5%, using an effect size of 1.05 and a common standard deviation (SD) of 0.62. Two experimental rats were added to the experimental group to compensate possible losses. Then, the rats were randomized to one of three groups: an experimental group (10 rats with a unilateral mandibular defect filled with metal debris); a positive control group (eight rats with an empty unilateral mandibular defect); and a negative control group (two rats with no mandibular defect).

2.3 | Randomization and concealment

A table of random numbers was generated using Stata14 (StataCorp, College Station, TX, USA) for random allocation. To ensure concealment of allocation from the surgeon, an independent investigator (O.C-F.) allocated the rats using sealed, opaque and numbered envelopes. Since the negative control rats did not undergo surgery, their envelopes were labeled on the outside. The envelopes were opened sequentially just after the mandibular bone defects were made.

2.4 | Preparation of metal debris

Metal particles obtained from implantoplasty of Ti-6Al-4V dental implants (Avinent Implant System S.L., Santpedor, Spain) were collected. The authors followed a standardized implantoplasty protocol used in humans and previously described by Costa-Berenguer et al.²¹ In order to standardize the procedure, all implantoplasty procedures were performed by a single investigator (J.T.-S.). Implantoplasty was carried out to remove the threads of 4.8×13 mm dental implants (Coral E.C., Avinent Implant System S.L., Santpedor, Spain). The implant surface was sequentially modified with a fine-grained tungsten carbide bur (H379.314. 014, KOMET GmbH & Co. KG, Lemgo, Germany) and two silicon carbide polishers (9608.314.030 and 9618.314.030, KOMET GmbH & Co. KG, Lemgo, Germany).

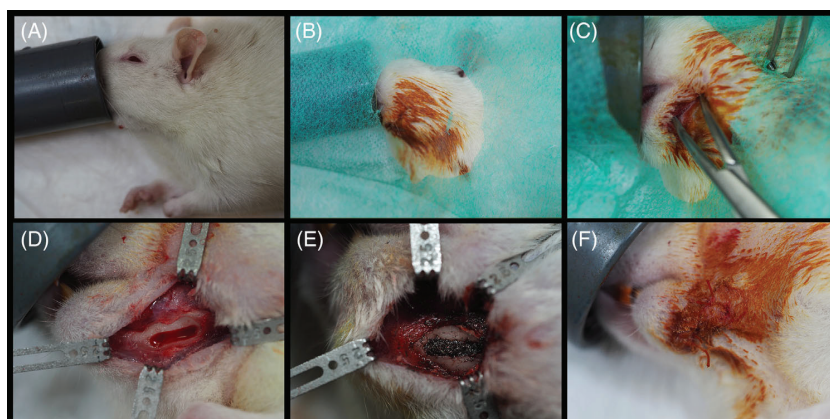


FIGURE 1 Surgical procedure. Inhalation anesthesia (A), disinfection of the surgical area (B), incision (C), dissection (D), bone exposition (E), bone defect (F), metal particles filling bone defect (G) and suture (H)

2.5 | Surgical protocol

The surgical procedure was performed by a single experienced investigator (M.A.S.-G.). Anesthesia was induced in a chamber using 5% isoflurane (Forane, Abbott Laboratories, Madrid, Spain) and a continuous oxygen flow of 5 L/min. Buprenorphine (Buprex, RB Pharmaceuticals Ltd., Slough, Berkshire, UK) was given at a dosage of 0.1 mg/kg subcutaneously. A single dose of enrofloxacin 10 mg/kg (Baytril, Bayer Hispania, Barcelona, Spain) was also administered as antibiotic prophylaxis. The experimental animals were connected to a breathing machine (New Generation Black Mk-TCIII, NSS, UK) for anesthetic maintenance with an oxygen flow of 0.7–0.8 L/min and vaporized isoflurane 2–2.5% at 3.5 L/min. Additionally, 1 ml of 4% articaine with 1:100,000 adrenaline (Ultracain, Laboratorios Normon, Tres Cantos, Madrid, Spain) was infiltrated in the mandibular zone.

After verifying the depth of anesthesia, the surgical area was disinfected with 10% topical povidone iodine (Iodine, Laboratorios Reig Jofré, Sant Joan Despí, Barcelona, Spain) and surgically dressed. The tail of the rat was immersed in hot water for 10 minutes and, after applying 70% ethanol, 1.5 ml of blood was collected from an incision.²² Afterward, the animals were immobilized using a magnetic fixator retraction system (Fine Science Tools, Foster City, CA, USA).²³ A 1.5-cm long anteroposterior incision was made in the submandibular skin. After exposing the inferior border of the mandible through blunt dissection, a standardized rectangular bone defect (6 × 2 mm) was created following a previously described model.²⁴ Bone was removed with a rounded bur at 2000 rpm under sterile saline irrigation. Immediately after the mandibular bone defects were made, the envelopes with the alloca-

tion sequence were opened. In the experimental group, the bone defects were filled with metal particles up to the top of the defect. Metal particles gathered by implantoplasty of the coronal half of a 4.8 × 13 mm dental implant (Coral E.C., Avinent Implant System S.L., Santpedor, Spain) were inserted into the defect. The defects of positive controls were left empty. The wound was sutured with Vicryl 4-0 (Laboratorios Aragó, Barcelona, Spain). Figure 1 shows the surgical steps.

During the first 2 postoperative days, meloxicam 2 mg/kg (Metacam, Boehringer Ingelheim, Sant Cugat del Vallés, Barcelona, Spain) was administered subcutaneously every 24 h.

Thirty days after surgery, the animals underwent euthanasia by inhalation of a CO₂-saturated atmosphere. Prior to euthanasia, the rats were anesthetized with 5% isoflurane as previously described. The same blood collection procedure was repeated to collect 1.5 ml of blood from the tail.

2.6 | Sample collection and processing

The sample of perilesional tissue obtained by dissection from the surgical site was immediately fixed with formaldehyde in 10% aqueous solution (order number HT501128-4L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The blood, liver, spleen, brain and both lungs were extracted and frozen at -80°C for subsequent lyophilization.

Lyophilization is a process that aims to separate water (or some other solvent) from a solution by freezing and sublimation of the ice at reduced pressure. This procedure is the best method for drying organic compounds without altering their qualitative or quantitative composition.



2.7 | Quantification of metal ions

The quantitative analysis of Ti, Al, and V ions in blood and organs was performed by investigators unaware of the allocation of each sample.

2.7.1 | Instrumentation

Microwave-assisted digestions were performed in an Ethos 1 system (Milestone, Sorisole, Italy) equipped with TFM microsampling inserts for lower sample consumption and dilution. The ICP-MS measurements were carried out in an iCAP TQ triple-quadrupole instrument (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The TQ-ICP-MS was fitted with a micromist nebulizer, a cyclonic spray chamber and copper/nickel sampling and skimmer cones. The samples, digestion reagents and final dilutions were weighed in an analytical balance (Mettler Toledo, Chicago, IL, USA) with ± 0.1 mg accuracy.

2.7.2 | Reagents

Ultrapure water (<18 M Ω ·cm) obtained from a PURELAB flex 3 system (ELGA VEOLIA, Lane End, High Wycombe, UK) was used for all solutions and working standards. Concentrated nitric acid (HNO₃) of analytical grade was purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) and purified by sub-boiling distillation. Hydrogen peroxide (H₂O₂) as a 30% solution was obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Hydrofluoric acid (HF) 99.99% (metal basis purity) from Alfa Aesar was purchased from Fisher Scientific (Hampton, USA).

Contamination from reagents and vessels used for the digestion of the tissues was minimized by careful manipulation. At the beginning, hydrogen peroxide was not used, since it did not provide any significant improvement in the recoveries and in the repetition RSD (relative standard deviation) was higher. The purification of concentrated nitric acid by sub-boiling distillation was carried in the LO setting (lowest distillation rate) and an initial cleaning protocol to produce trace metal grade acid was performed using a double distillation of ultrapure water. In addition, when collecting the Milli-Q water used for further dilution of standards and samples, the first 500 ml were discarded. Clean-up of the polypropylene containers (used for dilution of the samples prior to their analysis by ICP-MS) with 1% nitric acid was conducted overnight. Subsequently, they were rinsed with Milli-Q water before sample preparation.

TABLE 1 Microwave digestion programs

	For organs	For blood
Step 1	10 min room temperature to 90°C	15 min room temperature to 90°C
Step 2	6 min 90 to 140°C	15 min 90 to 140°C
Step 3	5 min 140 to 200°C	15 min 140 to 200°C
Step 4	10 min hold at 200°C	10 min hold at 200°C
Step 5	1 h cooling to room temperature	1 h cooling to room temperature

2.7.3 | Microwave-assisted digestion

The lyophilized samples were grinded using an agate mortar, and 0.1 g of each sample was placed in the microwave digestion inserts. Twenty-five microliter of HF were first added and allowed to react with the sample powder for 5 min. Then, 2 ml of HNO₃ were added and the samples were subjected to the microwave heating program specified in Table 1. The digested samples were finally diluted 10-times in 2% HNO₃.^{20,25}

Due to the more complex nature of the matrix in blood samples, 0.1 g of freeze-dried blood was incubated with 25 μ l of HF and 2 ml of HNO₃ for one hour at room temperature before applying the modified digestion program in the microwave, as shown in Table 1. The use of totally new sample vessels specially designed for microsamples intended to minimize external contamination. Between samples, the inserts were cleaned using 2 ml of 50% (v/v) HNO₃ and 25 μ l of concentrated HF. The MW heating program for the cleaning was carried out using 10 min ramp up to 150°C, 10 min hold at 150°C (MW power of 900 W in both steps) and a cooling step for 60 min up to room temperature. Afterward, inserts were rinsed with ultrapure water and dried before the next run.

2.7.4 | ICP-MS measurements

Ti was measured in the TQ-ICP-MS by monitoring the isotope ⁴⁷Ti⁺ to avoid interference of the long half-life ⁴⁸Ca⁺ isotope on the most abundant isotope ⁴⁸Ti⁺. The analysis was carried out in triple-quadrupole (TQ) mode using oxygen in the second quadrupole to form ⁴⁷Ti¹⁶O⁺, which is monitored in the m/z 63. Vanadium was also measured as its most abundant oxide, ⁵¹V¹⁶O⁺, in TQ-O₂ mode, at m/z 67. Aluminum was measured in single-quadrupole (SQ) mode as ²⁷Al⁺. All analyses were quantified by external calibration using elemental standards, and scandium was used as internal standard. The sample measurement time was 2 min per sample and the calibration curve was prepared for Ti, Al and V with standards of 0, 0.25, 0.50, 1, 2.5, and 5 ng g⁻¹ (solutions prepared by weight). The



instrumental detection limit estimated as 3σ (blanks)/slope of the calibration curve was $0.007 \text{ ng Ti ml}^{-1}$, $0.158 \text{ ng Al ml}^{-1}$ and $0.002 \text{ ng V ml}^{-1}$. Sensitivity (slope of the calibration curve) for Ti is 69000 cps/ppb ($r^2 = 0.9992$), which is extremely low. However, considering the dilutions conducted in the samples this translated into 1.75 , 39 , and 0.51 ng g^{-1} of tissue for Ti, Al, and V, respectively. The measurement of each prepared sample was done by triplicate, and for every organ a duplicate of the digestion was prepared. Reproducibility within measured replicates was between 2% and 3% in all cases and between procedure replicates (including digestion) below 15% for the three elements.

2.8 | Histological samples

Histological analysis of the perilesional tissue of the surgical site was performed by an experienced pathologist (S.B.). The tissue was fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin after decalcification.²⁶ Then, paraffin blocks were sectioned using a Microm HM 340 E rotatory microtome (Thermo Fisher Scientific, Wall-dorf, Germany) to a thickness of $5 \mu\text{m}$ for staining with hematoxylin-eosin (HE).

A light microscope (CX31, Olympus, Tokyo, Japan) was used to study the histological samples. In addition, a Leica DMD 108 microscope (Leica Company, Wetzlar, Germany) was used to obtain microphotographs.

2.9 | Statistical analysis

The data obtained were entered in a Microsoft Excel spreadsheet (Microsoft, Redmond, WA, USA) and processed using the Stata 14 statistical package (StataCorp, College Station, TX, USA).

For the descriptive analysis, the median and interquartile range (IQR) were calculated. Differences between groups were tested with the Mann-Whitney U-test, and within-subject changes were assessed with the Wilcoxon test. Regarding the analysis of metal ions, extreme outliers (defined as values above the 75th percentile and three times the IQR) were detected. We conducted the statistical analysis with and without these outliers. Finally, data were presented without outliers. In all cases, statistical significance was considered for $p \leq 0.05$.

3 | RESULTS

Of the 20 rats that underwent surgery, one in the positive control group died during the first 24 h of the postoperative period. Thus, ion quantification and histological analysis of the samples were finally carried out in 10 rats of the

experimental group, seven of the positive control group, and two of the negative control group.

3.1 | Quantification of metal ions

The distribution of metal ion concentrations in blood and organs is shown in Figure 2. Tables 2 and 3 display the concentration of metal ions in blood and organs, respectively. These data were presented without the outlier values.

3.1.1 | Blood

There were no statistically significant differences between the study groups in terms of Ti, Al, or V ion concentrations. However, in the experimental group the concentration of Al was significantly lower in the post-intervention sample compared to the pre-intervention sample (Table 2).

The two rats of the negative control group (not operated) showed the following concentrations of metal ions in the pre-intervention sample: range [Ti] = $160.5\text{--}371.3 \text{ ng/g}$; range [Al] = $747.9\text{--}758.3 \text{ ng/g}$; range [V] = $4.12\text{--}14.6 \text{ ng/g}$, while the post-intervention concentrations were: range [Ti] = $149.6\text{--}165.4 \text{ ng/g}$; range [Al] = $689.0\text{--}1149.5 \text{ ng/g}$; range [V] = $4.9\text{--}5.3 \text{ ng/g}$.

3.1.2 | Visceral tissues

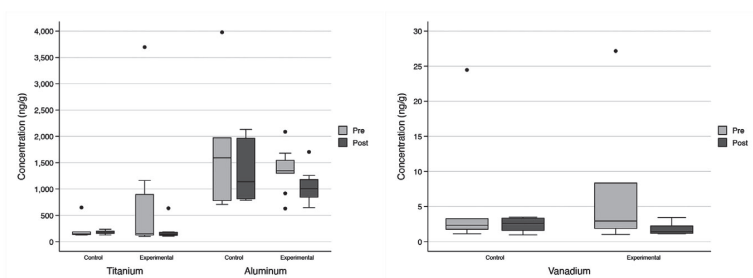
The concentrations of Ti ions in brain ($p = 0.010$), spleen ($p = 0.037$) and liver ($p = 0.014$) were significantly higher in the experimental group than in the positive controls (Table 3). In addition, there also was a higher concentration of V ions in the brain of the experimental rats ($p = 0.016$; Table 3). There were no statistically significant differences in Al ion concentrations (Table 3).

The concentrations of metal ions are reported in parentheses for the two rats of the negative control group in brain (range [Ti] = $420.4\text{--}497.0 \text{ ng/g}$; range [Al] = $1254.5\text{--}1858.6 \text{ ng/g}$; range [V] = $5.7\text{--}7.2 \text{ ng/g}$), spleen (range [Ti] = $421.9\text{--}447.1 \text{ ng/g}$; range [Al] = $1113.6\text{--}1133.7 \text{ ng/g}$; range [V] = $37.3\text{--}55.0 \text{ ng/g}$), lungs (range [Ti] = $291.4\text{--}318.7 \text{ ng/g}$; range [Al] = $1555.2\text{--}2203.6 \text{ ng/g}$; range [V] = $8.4\text{--}11.0 \text{ ng/g}$) and liver (range [Ti] = $374.1\text{--}493.7 \text{ ng/g}$; range [Al] = $751.0\text{--}1160.6 \text{ ng/g}$; range [V] = $9.4\text{--}10.4 \text{ ng/g}$).

3.2 | Histological samples

All specimens consisted of mucosa lined by squamous epithelium, submucosa, skeletal muscle, accessory salivary glands, alveolar bone, and teeth.

(A) Blood



(B) Organs

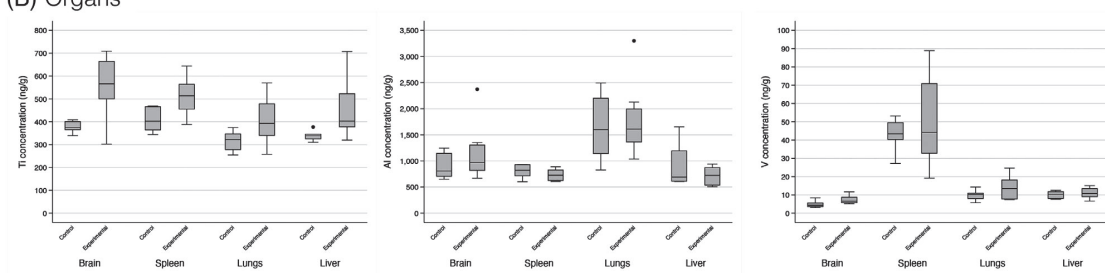


FIGURE 2 Boxplots of titanium, aluminum, and vanadium ion concentrations in blood (A) and organs (B)

TABLE 2 Results of the quantification of ions in blood: Data expressed as median (IQR)

Study groups			Between-group comparison	Within-group comparison	
Quantification of ions	Experimental	Positive control	<i>p</i> -value experimental versus control group	<i>p</i> -value experimental group pre-intervention versus post-intervention	<i>p</i> -value control group pre-intervention versus post-intervention
Blood, ng/g					
Pre-intervention					
Titanium (<i>n</i> = 17)	157.9 (769.3)	148.05 (50.3)	0.939		
Aluminum (<i>n</i> = 18)	1347.9 (245.9)	1593.7 (1192.1)	0.9854		
Vanadium (<i>n</i> = 16)	2.95 (6.47)	2.36 (1.5)	0.755		
Post-intervention					
Titanium (<i>n</i> = 17)	145.4 (59.3)	165.6 (44.4)	0.746	0.161	0.600
Aluminum (<i>n</i> = 18)	1004.5 (334.9)	1138.3 (1149.8)	0.731	0.028*	0.735
Vanadium (<i>n</i> = 16)	1.43 (1.05)	2.64 (1.75)	0.682	0.063	0.917

*statistically significant ($p < 0.05$).

In the experimental group, metal particles were present as black deposits of irregular contour and birefringent under polarized light. As shown in Figure 3A, there was a granulomatous reaction with the presence of histiocytes and multinucleated giant cells (MNGCs) around the metal particles. Small metal particles were found within the cytoplasm of the MNGCs (Figure 3B).

Disordered mature bone with irregular ossification lines corresponding to a fracture bone callus was detected in all

specimens of the experimental and positive control groups (Figure 3C).

4 | DISCUSSION

The present study evaluated whether the implantation of metal particles in a mandibular defect in rats resulted in the dissemination of metal ions to the blood, liver, spleen,

TABLE 3 Results of the quantification of ions in organs: Data expressed as median (IQR)

Quantification of ions	Study groups Experimental	Between-group comparison Positive control	p-value experimental versus control group
Organs, ng/g			
Brain			
Titanium (n = 19)	565.6 (163.2)	374.6 (35.6)	0.010*
Aluminum (n = 19)	971.1 (487.3)	806.6 (440.5)	0.512
Vanadium (n = 19)	6.5 (3.1)	4.3 (2.0)	0.016*
Spleen			
Titanium (n = 19)	513.3 (108.2)	402.5 (100.9)	0.037*
Aluminum (n = 17)	726.0 (201.5)	819.9 (214.6)	0.721
Vanadium (n = 18)	44.2 (38.1)	43.4 (9.2)	0.988
Lungs			
Titanium (n = 18)	392.7 (138.8)	322.3 (69.0)	0.135
Aluminum (n = 18)	1610.2 (633.9)	1599.7 (1060.8)	0.988
Vanadium (n = 18)	13.4 (10.4)	10.2 (3.0)	0.632
Liver			
Titanium (n = 18)	402.8 (145)	338.7 (20.4)	0.014*
Aluminum (n = 19)	723.5 (337.2)	689.3 (584.5)	0.978
Vanadium (n = 19)	10.8 (4.4)	10.3 (3.8)	0.940

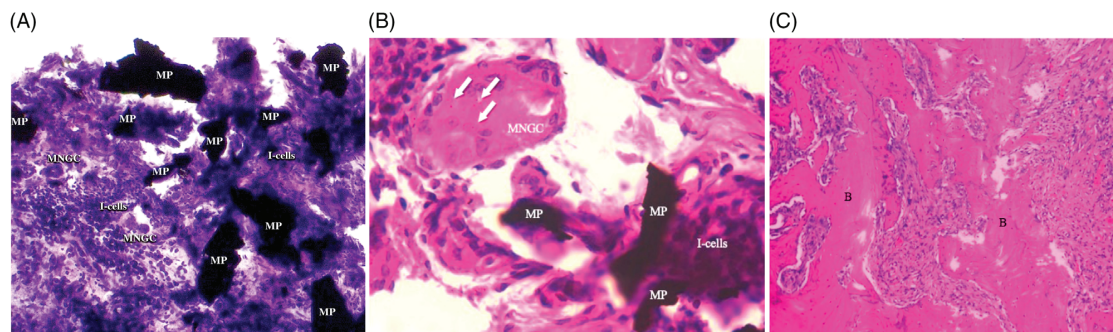
*statistically significant ($p < 0.05$).

FIGURE 3 Granulomatous reaction with the presence of histiocytes and multinucleated giant cells around metal particles. MNGCs, multinucleated giant cells; MP, metal particle; I-cells, inflammatory cells. Hematoxylin-eosin staining; magnification $\times 20$. (A) Small metal particles within the cytoplasm of the multinucleated giant cells (arrows). MNGCs, multinucleated giant cells; MP, metal particle; I-cells, inflammatory cells. Hematoxylin-eosin staining; magnification $\times 63$. (B) Disordered mature bone with irregular ossification lines corresponding to a fracture bone callus. B, bone. Hematoxylin-eosin staining; magnification $\times 10$ (C)

lungs, and brain 30 days after surgery. To our knowledge, this is the first study to quantify the accumulation of metal ions in distant organs after the implantation of Ti metal particles from dental implants. The results obtained indicate a higher concentration of Ti ions in the liver, spleen, and brain of the rats in the experimental group compared to the positive control group. There was also a higher concentration of V ions in the brain of the experimental rats. On the other hand, the histological findings suggest that

the metal debris induced a granulomatous reaction with the presence of histiocytes and MNGCs characteristic of a foreign body reaction.

The present study has some limitations that should be commented on. First, the study period was only 30 days; as a result, the effects of these particles over the middle and long term are not known. Second, the experimental rats had a mandibular defect that was filled with metal particles. Although this model does not mimic the clinical



situation in implantoplasty, the mobilization of metal ions from the implanted site to organs and the local reaction simulate a clinical scenario, in which debris cannot be fully removed from the surgical field. On the other hand, the presence of Ti, Al, and V ions could come from other sources, and the variations of these ions might not be explained only by the presence of implant debris. These ions, especially Ti and Al, are difficult to measure due to the high environmental backgrounds coming, most likely, from food and drinking water. Ti dioxide is a common food additive (also for humans), although recently banned by the European Union (EU).²⁷ In addition, the presence of Ti in waters has been well documented.²⁷ Therefore, small variations due to the Ti metal particles above the relatively high blanks are expected to hamper ultratrace analysis. Similar reasons can be given for Al determination.^{20,28} It is worth noting that outliers were removed from the analysis because statistical power was over 80% even after removal, and analysis with and without outliers yielded the same significance of results. Negative control rats had a higher concentration of some metal ions than positive controls, which possibly reflects that rats did not have feeding difficulties.

Commercially pure Ti or Ti alloy is commonly used in dental implants and orthopedics due to its corrosion resistance, biocompatibility, and mechanical properties.²⁹ Although Ti has been typically regarded as inert, several studies have reported that Ti implants can undergo corrosion and wear, releasing metal particles into the medium.³⁰ Such metal debris can be transported to other tissues, and may even lead to adverse events including cytotoxicity, genotoxicity, carcinogenicity, and metal hypersensitivity.^{20,28} In the present study, dissemination of Ti and V ions from the mandibular defect to certain organs of the rat was observed 30 days after the implantation of these metal particles. There was a decrease in the concentration of Al ions in the blood of the experimental group. Indeed, concentration of aluminum ions in the positive control group decreased across time, although the difference was not statistically significant. Therefore, both groups appear to have a decrease in serum aluminum levels, which might be due to the ubiquitous nature of aluminum.³¹ It must be pointed out that the concentration of metal ions in the different tissues was low (ng/g), and that their potential clinical effects are still unknown. Future studies should address the effects of the accumulation of these metal ions since Ti nanoparticles and ions may exert cytotoxic effects upon human cells.²⁸

Some authors have suggested that bone loss around dental implants may be caused or accelerated by an inflammatory reaction in response to the presence of metal particles or ions.^{5,6} In fact, Ti particles and ions are more common in peri-implantitis sites and can cause dysbiosis

of the peri-implant biofilm.³² There are several mechanisms by which metal particles can be released into the peri-implant environment, such as implant insertion,³³ micromovements of the implant in the bone,³⁴ the methods used to decontaminate peri-implant surfaces²⁶ or biocorrosion.³⁵ Among these mechanisms, implantoplasty is undoubtedly the technique that releases the greatest amount of metal particles into the peri-implant environment. Barrak et al.,³⁶ in an *in vitro* study, reported that irregularly shaped micro- and nanoparticles are released during implantoplasty. In addition, these authors found that Ti-6Al-4V particles caused a greater reduction of fibroblast cell viability compared to commercially pure Ti. In this line, a recent study showed that the same metal particles used in the present study exhibited cytotoxic effects in the fibroblast cell assays in the undiluted extract, but not in the diluted extracts.³⁷

Our results show that the metal particles embedded in an experimental rat jaw defect triggered chronic inflammation with a foreign body granulomatous reaction characterized by the presence of histiocytes and MNGCs. On the other hand, a bone callus was observed in all the histological samples of the experimental and positive control groups, which did not differ between the study groups. Schwarz et al.³⁸ conducted an experimental study in six dogs and histologically examined the effect of Ti metal particles released during implantoplasty around the dental implants. They reported a moderate deposition of Ti particles surrounded by highly vascularized areas delimited by a mixed chronic inflammatory cell infiltrate. Other authors^{39–42} reported that Ti metal particles induce a chronic inflammatory cell infiltrate associated to a foreign body reaction, which is in line with the results of our study. Future studies should consider the evaluation of the inflammatory process in the subepithelial connective tissue around metal particles, for instance by quantifying proinflammatory cytokines.

In the field of orthopedics, metal particles and ions induce immune responses leading to osteolysis around the prosthesis in an absence of bacteria—a condition known as aseptic osteolysis.⁴³ Friction between the joint surfaces causes wear of the prosthesis, and the released metal particles induce a local periprosthetic osteolytic reaction.⁴⁴ This complication predominantly occurs 5 years post-orthopedic implantation⁴³ and is characterized by histiocytic inflammation and activation of osteoclasts, leading to osteolysis and consequently joint prosthesis failure.⁴⁵ Histologically, a granulomatous reaction is observed, with black and birefringent particles.⁴² These findings are consistent with the histological findings in our experimental rats. Thus, metal particles embedded in a mandible may have a detrimental effect upon the peri-implant tissues, and the mechanism involved could be similar to that



observed in total joint replacement surgery. Indeed, bone loss around dental implants may be increased due to the abundance of bacteria in the mouth.³³ However, long-term studies and methodologies that mimic the real scenario are still required to determine the effects of these metallic particles upon implant survival.

5 | CONCLUSION

In summary, 1 month after implantation of Ti metal particles, we observed a granulomatous inflammatory reaction with the presence of histiocytes and MNGCs. In addition, the concentration of Ti ions increased in the liver, spleen, and brain, as the concentration of vanadium ions in the brain.

ACKNOWLEDGMENTS AND CONFLICTS OF INTEREST

This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III through project PI20/01596 (co-funded by the European Regional Development Fund [ERDF], a way to build Europe).

The authors thank the CERCA Program / Generalitat de Catalunya for institutional support.

The authors thank Dr. Samira Bakali Badesa, the pathologist who studied the histological specimens, for her help and assistance.

The authors thank Prof. Dr. Albert Soler-Gil (MAiMA Group) for his help in lyophilization of the samples.

Jorge Toledano-Serrabona has received no grants, personal fees, or financial support.

Diogo Pompéu de Moraes kindly acknowledges the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 for scholarship.

Mario Corte-Rodríguez reports grants from the government of Asturias through the “Consejería de Empleo, Industria y Turismo del Principado de Asturias” co-financed by FEDER funds (ref. SV-PA-21-AYUD/2021/51399), the funding from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) through project PID2019-104334RB-I00. Mario Corte-Rodríguez acknowledges the Instituto de Salud Carlos III for the postdoctoral Sara Borrell contract (CD19/00249).

María Montes-Bayón reports grants from the government of Asturias through the “Consejería de Empleo, Industria y Turismo del Principado de Asturias” co-financed by FEDER funds (ref. SV-PA-21-AYUD/2021/51399), the funding from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) through project PID2019-104334RB-I00.

Octavi Camps-Font reports grants from Instituto de Salud Carlos III during the conduct of the study. Octavi Camps-Font reports grants, personal fees, and non-financial support from Avinent (Santpedor, Spain) outside the submitted work. Camps-Font has participated as co-investigator in clinical trials sponsored by Mundipharma (Cambridge, UK) and Menarini Recherche (Florence, Italy).

Eduard Valmaseda-Castellón reports grants from Instituto de Salud Carlos III during the conduct of the study. Eduard Valmaseda-Castellón reports personal fees and non-financial support from MozoGrau (Valladolid, Spain). He has received personal fees from BioHorizons Ibérica (Madrid, Spain), Inibsa Dental (Llíça de Vall, Spain), and Dentsply Implants Iberia (Barcelona, Spain) outside the submitted work. Valmaseda-Castellón is the director of the Avinent-University of Barcelona research agreement (Càtedra UB-Avinent). In addition, Valmaseda-Castellón has participated as an investigator in clinical trials sponsored by Mundipharma (Cambridge, UK) and Geistlich (Wolhusen, Switzerland) outside the submitted work.

Cosme Gay-Escoda reports grants from Instituto de Salud Carlos III during the conduct of the study. Cosme Gay-Escoda reports grants, personal fees, and non-financial support from Mundipharma (Cambridge, UK) and Menarini Recherche (Florence, Italy) outside the submitted work.

M^a Ángeles Sánchez-Garcés reports grants from Instituto de Salud Carlos III during the conduct of the study. M^a Ángeles Sánchez-Garcés reports personal fees from Nobel Biocare (Göteborg, Sweden), Zimmer Biomet (Warsaw, IN, USA), and Menarini Recherche (Florence, Italy) outside the submitted work.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Jorge Toledano-Serrabona: contributed to conception, design, data acquisition and interpretation, and drafted the manuscript. Octavi Camps-Font: contributed to design, data interpretation, and critically reviewed the manuscript. Diogo Pompéu de Moraes and María Montes-Bayón: contributed to data acquisition and interpretation, and critically reviewed the manuscript. Mario Corte-Rodríguez: contributed to data acquisition and critically reviewed the manuscript. Eduard Valmaseda-Castellón: contributed to design, data acquisition and interpretation, and critically reviewed the manuscript. Cosme Gay-Escoda: contributed to conception, design, and critically reviewed the manuscript. María Ángeles Sánchez-Garcés: contributed to conception, design, data acquisition, and critically reviewed the manuscript. All authors gave final approval and agree to be accountable for all aspects of the work.



ORCID

Jorge Toledano-Serrabona <https://orcid.org/0000-0002-0166-8876>

Octavi Camps-Font <https://orcid.org/0000-0001-9991-2226>

Diogo Pompéu de Moraes <https://orcid.org/0000-0003-4992-5226>

Mario Corte-Rodríguez <https://orcid.org/0000-0003-0109-4101>

María Montes-Bayón <https://orcid.org/0000-0001-6114-9405>

Eduard Valmaseda-Castellón <https://orcid.org/0000-0001-9669-3187>

Cosme Gay-Escoda <https://orcid.org/0000-0002-6812-024X>

M. Ángeles Sánchez-Garcés <https://orcid.org/0000-0002-8818-7142>

REFERENCES

- Barrak F, Li S, Muntane A, Bhatia M, Crossthwaite K, Jones J. Particle release from dental implants immediately after placement—an ex vivo comparison of different implant systems. *Dent Mater*. 2022;38(6):1004-1014.
- Moraschini V, Poubel LA da C, Ferreira VF, Barboza E dos SP. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(3):377-88.
- Rakic M, Galindo-Moreno P, Monje A, et al. How frequent does peri-implantitis occur? A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2018;22:1805-16.
- Schwarz F, Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Periodontol*. 2018;89:S267-290.
- Fretwurst T, Nelson K, Tarnow DP, Wang HL, Giannobile WV. Is metal particle release associated with peri-implant bone destruction? An emerging concept. *J Dent Res*. 2018;97:259-265.
- Wilson TG. Bone loss around implants—is it metallosis? *J Periodontol*. 2021;92:181-185.
- Hanawa T. Titanium-tissue interface reaction and its control with surface treatment. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7:170.
- Apaza-Bedoya K, Tarce M, Benfatti CAM, et al. Synergistic interactions between corrosion and wear at titanium-based dental implant connections: a scoping review. *J Periodontol Res*. 2017;52:946-54.
- Toledano-Serrabona J, Sánchez-Garcés MÁ, Gay-Escoda C, et al. Mechanical properties and corrosion behavior of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: an in vitro study. Part II. *Materials (Basel)*. 2021;14:6519.
- Mathew MT, Kerwell S, Lundberg HJ, Sukotjo C, Mercuri LG. Tribocorrosion and oral and maxillofacial surgical devices. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014;52:396-400.
- Noronha Oliveira M, Schunemann WVH, Mathew MT, et al. Can degradation products released from dental implants affect peri-implant tissues? *J Periodontol Res*. 2018;53:1-11.
- Tinoco AD, Saxena M, Sharma S, et al. Unusual synergism of transferrin and citrate in the regulation of Ti(IV) speciation, transport, and toxicity. *J Am Chem Soc*. 2016;138:5659-5665.
- Suárez-López del Amo F, Rudek I, Wagner V, et al. Titanium activates the DNA damage response pathway in oral epithelial cells: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017;32:1413-1420.
- Kotsakis GA, Black R, Kum J, et al. Effect of implant cleaning on titanium particle dissolution and cytocompatibility. *J Periodontol*. 2021;92:580-591.
- Rakic M, Radunovic M, Petkovic-Curcin A, Tatic Z, Basta-Jovanovic G, Sanz M. Study on the immunopathological effect of titanium particles in peri-implantitis granulation tissue: a case-control study. *Clinical Oral Implants Res*. 2022;33(6):656-666.
- Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennnerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014;16:155-165.
- Swiatkowska I, Martin N, Hart AJ. Blood titanium level as a biomarker of orthopaedic implant wear. *J Trace Elem Med Biol*. 2019;53:120-128.
- Heyman O, Koren N, Mizraji G, et al. Impaired differentiation of Langerhans cells in the murine oral epithelium adjacent to titanium dental implants. *Front Immunol*. 2018;9:1-14.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8:e1000412.
- Sarmiento-González A, Encinar JR, Marchante-Gayón JM, Sanz-Medel A. Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear, as determined by double-focusing ICP-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2009;393:335-343.
- Costa-Berenguer X, García-García M, Sánchez-Torres A, Sanz-Alonso M, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E. Effect of implantoplasty on fracture resistance and surface roughness of standard diameter dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29:46-54.
- Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFPAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim*. 1993;27:1-22.
- Padial-Molina M, Rodríguez JC, Volk SL, Rios HF. Standardized in vivo model for studying novel regenerative approaches for multilayer bone-ligament interfaces. *Nat Protoc*. 2015;10:1038-1049.
- Liu G, Guo Y, Zhang L, et al. A standardized rat burr hole defect model to study maxillofacial bone regeneration. *Acta Biomater*. 2019;86:450-464.
- Taboada-López MV, Iglesias-López S, Herbello-Hermelo P, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis for isolating titanium dioxide nanoparticles from bivalve mollusk before sp-ICP-MS. *Anal Chim Acta*. 2018;1018:16-25.
- Liu H, Zhu R, Liu C, et al. Evaluation of decalcification techniques for rat femurs using he and immunohistochemical staining. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9050754.
- Candás-Zapico S, Kutscher DJ, Montes-Bayón M, Bettmer J. Single particle analysis of TiO₂ in candy products using triple quadrupole ICP-MS. *Talanta*. 2018;180:309-315.
- Soto-Alvaredo J, Blanco E, Bettmer J, et al. Evaluation of the biological effect of Ti generated debris from metal implants: ions and nanoparticles. *Metallomics*. 2014;6:1702-1708.



29. Siddiqi A, Payne AGT, De Silva RK, Duncan WJ. Titanium allergy: could it affect dental implant integration? *Clin Oral Implants Res.* 2011;22:673-680.
30. Wachi T, Shuto T, Shinohara Y, Matono Y, Makihira S. Release of titanium ions from an implant surface and their effect on cytokine production related to alveolar bone resorption. *Toxicology.* 2015;327:1-9.
31. Peydayesh M, Pauchard M, Bolisetty S, Stellacci F, Mezzenga R. Ubiquitous aluminium contamination in water and amyloid hybrid membranes as a sustainable possible solution. *Chem Commun.* 2019;55:11143-11146.
32. Souza JGS, Costa Oliveira BE, Bertolini M, et al. Titanium particles and ions favor dysbiosis in oral biofilms. *J Periodontol Res.* 2020;55:258-266.
33. Silva GAF, Faot F, da Silva WJ, Del Bel Cury AA. Does implant surface hydrophilicity influence the maintenance of surface integrity after insertion into low-density artificial bone? *Dent Mater.* 2021;37:69-84.
34. Sridhar S, Wang F, Wilson TG, Palmer K, Valderrama P, Rodrigues DC. The role of bacterial biofilm and mechanical forces in modulating dental implant failures. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019;92:118-127.
35. Mombelli A, Hashim D, Cionca N. What is the impact of titanium particles and biocorrosion on implant survival and complications? A critical review. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29:37-53.
36. Barrak FN, Li S, Muntane AM, Jones JR. Particle release from implantoplasty of dental implants and impact on cells. *Int J Implant Dent.* 2020;6:1-9.
37. Toledano-Serrabona J, Gil FJ, Camps-Font O, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ. Physicochemical and biological characterization of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: an in vitro Study. Part I. *Materials (Basel)* 2021;14:6507.
38. Schwarz F, Sahm N, Mihatovic I, Golubovic V, Becker J. Surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects: cone-beam computed tomographic and histological analysis. *J Clin Periodontol.* 2011;38:939-949.
39. Eger M, Sterer N, Liron T, Kohavi D, Gabet Y. Scaling of titanium implants entrains inflammation-induced osteolysis. *Sci Rep.* 2017;7:1-11.
40. Wang X, Li Y, Feng Y, Cheng H, Li D. Macrophage polarization in aseptic bone resorption around dental implants induced by Ti particles in a murine model. *J Periodontol Res.* 2019;54:329-338.
41. Pisanu F, Andreozzi M, Fiori E, et al. Surgical management of hip prosthetic failure in metallosis: a case series and literature review. *J Orthop.* 2021;28:10-20.
42. Cipriano CA, Issack PS, Beksac B, Della Valle AG, Sculco TP, Salvati EA. Metallosis after metal-on-polyethylene total hip arthroplasty. *Am J Orthop (Belle Mead NJ).* 2008;37:18-25.
43. Lohmann CH, Singh G, Willert H-G, Buchhorn GH. Metallic debris from metal-on-metal total hip arthroplasty regulates periprosthetic tissues. *World J Orthop.* 2014;5:660-666.
44. Bitar D, Parvizi J. Biological response to prosthetic debris. *World J Orthop.* 2015;6:172-189.
45. Holt G, Murnaghan C, Reilly J, Meek RM. The biology of aseptic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;460:240-252.

How to cite this article: Toledano-Serrabona J, Camps-Font O, de Moraes DP, et al. Ion release and local effects of titanium metal particles from dental implants: An experimental study in rats. *J Periodontol.* 2022;1-11.
<https://doi.org/10.1002/JPER.22-0091>

Estudio 5:

Rastreo del titanio nanoparticulado liberado in vivo a partir de residuos metálicos de implantes dentales empleando SP-ICP-MS.

- **Autores:** de Moraes DP, González-Morales S, **Toledano-Serrabona J**, Sánchez-Garcés MÁ, Bettmer J, Montes-Bayón M, Corte-Rodríguez M.
- **Título:** Tracking nanoparticulate titanium released in-vivo from metal dental implant debris using (single-particle)-ICP-MS
- **Referencia completa:** de Moraes DP, González-Morales S, Toledano-Serrabona J, Sánchez-Garcés MÁ, Bettmer J, Montes-Bayón M, Corte-Rodríguez M. Tracking nanoparticulated titanium released in-vivo from metal dental implant debris using (single-particle)-ICP-MS. 2022. Manuscrito en preparación*.

* De acuerdo con la normativa del programa de Doctorado de Medicina e Investigación Traslacional de la Universitat de Barcelona se ha incluido la metodología y los resultados del estudio 5 que aún no están publicados y en los que el doctorando no es primer autor.

“Las publicaciones presentadas para presentar una tesis doctoral en compendio de artículos deben corresponder a una misma unidad temática. Se deben aportar un mínimo de dos trabajos originales (publicados o aceptados para publicación) de los cuales la persona doctoranda debe ser autora. En uno de estos trabajos debe ser primera autora” [...] “Además, también se podrán incluir objetivos y resultados no publicados o publicados sin cumplir los criterios de autor/a o cuartil de la revista”.

Objetivo

Determinar la translocación de nanopartículas metálicas en sangre, bazo, pulmones, hígado y cerebro después de insertar los residuos metálicos generados durante la implantoplastia en un defecto mandibular en rata.

Material y Método

Instrumentación

Todas las mediciones se hicieron con un TQ-ICP-MS (iCAP, Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemania). El sistema de introducción de muestras tenía un automuestreador ASX-560 (Teledyne CETAC Technologies, Omaha, NE, EE.UU.) que se optimizó diariamente siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando una solución de ajuste que contiene Li, Co, In y U a nivel de 1 ng/mL. Las mediciones de ICP-MS de partícula única (SP-ICP-MS) se llevaron a cabo utilizando un tiempo de integración de 5 ms y un tiempo de adquisición de 120 s.

Para la optimización de la digestión ácida de las muestras se utilizó un microondas (Ethos-1, Milestone, Sorisole, Italia) equipado con 5 recipientes estándar TFM (SK-10T y rotor tipo HPR-1000/10S) con un volumen interno de 100 mL (presión y temperatura de funcionamiento de hasta 100 bar y 260 °C, respectivamente). La digestión de las muestras liofilizadas se realizó empleando micro-insertos que permiten disminuir el volumen de ácido empleado en el ataque mediante los recipientes TFM (PN 33607, Milestone, Sorisole, Italia) (estudio 4). Durante la digestión de la muestra se monitorizó la temperatura de los recipientes a través de una sonda.

También se emplearon otros instrumentos como un liofilizador (Heto Lyolab 3000, Thermo Fisher Scientific, Hamburgo, Alemania), centrifugadoras (Biofuge Stratos, Thermo Fisher Scientific y MiniSpin Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), agitador vortex (Reax Top, Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania), medidor de pH (SensION+ PH3, Hach, Barcelona, España), bloque térmico (ThermoMixer C, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y baño de ultrasonidos (Ultrasons 30000514, J. P. Selecta, Barcelona, España). Se utilizó una balanza analítica (MSD205DU/M, Mettler Toledo, EE.UU.) con una precisión de 0.0001 g para preparar todas las muestras, los estándares analíticos y para llevar a cabo todas las diluciones.

Reactivos y soluciones

El agua ultrapura obtenida de Purelab flex 3 (ELGA VEOLIA, Lone End, Reino Unido) con una resistividad mínima de $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a 25°C se empleó para preparar todas las soluciones y los reactivos. Para la digestión de las muestras se empleó ácido nítrico concentrado al 65 % (m/m) (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) destilado en un sistema de subebullición (DTS-1000 Acid Purification System, Savillex, Eden Prairie, EE.UU.), y ácido fluorhídrico concentrado al 40 % (m/m) (Alfa Aesar, Fisher Scientific, Hampton, EE.UU., 99.99 % base metálica). La purificación del ácido nítrico concentrado mediante destilación en subebullición se hizo en la configuración LO (tasa de destilación más baja).

La calibración del equipo de SP-ICP-MS para la cuantificación de nanopartículas de Ti se efectuó con soluciones estándar de Ti preparadas en agua ultrapura en el rango de 5 a $50 \mu\text{g/L}$. Estas soluciones estándar se prepararon utilizando una solución intermedia de este elemento de $1000 \mu\text{g/L}$ preparada en HNO_3 al 2 % (v/v) y HF al 1 % (v/v).

Se utilizó argón (99.999 % de pureza) y oxígeno (99.995 % de pureza), ambos de Air Liquide (Valladolid, España) para el funcionamiento del equipo de ICP-MS y para la celda de reacción, respectivamente.

Todo el material de laboratorio, los viales de polipropileno y otros frascos, se limpiaron antes de su uso sumergiéndolos en un baño de HNO₃ al 5 % (v/v) durante siete días y posteriormente se aclararon con agua ultrapura.

Muestras y protocolo del estudio in vivo

Los experimentos in vivo se llevaron a cabo en la Universitat de Barcelona previa aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universitat de Barcelona (número de identificación del protocolo 10799). Brevemente, se llevó a cabo un estudio experimental aleatorizado en 20 ratas Sprague-Dawley, 50 % machos y hembras, de 6 a 8 meses de edad y con pesos entre 380 y 450 g. Todos los animales se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos de estudio: grupo experimental (diez ratas con un defecto mandibular unilateral relleno con restos de metal), grupo control positivo (ocho ratas con un defecto mandibular unilateral vacío) y grupo control negativo (ocho ratas sin defecto mandibular). La detección de las nanopartículas de Ti se llevó a cabo en los grupos experimental y control positivo.

Las partículas metálicas utilizadas para rellenar el defecto mandibular se obtuvieron mediante la implantoplastia de implantes dentales de Ti6Al4V (Avinent Implant System S.L., Santpedor, España). En el estudio 4 se describen más detalles sobre el protocolo quirúrgico y las implicaciones biológicas del estudio in vivo.

Las muestras evaluadas en este estudio para evaluar la distribución del Ti nanoparticulado en los diferentes órganos se tomaron 30 días después de la cirugía. El hígado, el bazo, el cerebro y los pulmones fueron extraídos y congelados a -80 °C para su posterior liofilización. Las muestras de sangre se recogieron antes y después del procedimiento quirúrgico, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron. Todas las muestras se homogeneizaron en un mortero de ágata y se almacenaron en recipientes

de polipropileno a -18 °C hasta su uso para la digestión ácida en microondas o la digestión enzimática.

Digestión ácida en microondas mediante micro-insertos (MW-AD)

Los primeros ensayos se hicieron en recipientes de teflón de 100 mL. Se utilizó 0.1 g de tejido seco y se empleó un protocolo de digestión ácida sin el uso de HF. Sin embargo, con el objetivo de minimizar la dilución de las muestras, se estudió la posibilidad de utilizar micro-insertos por lo que se llevó a cabo una digestión ácida de la muestra con 25 µl de HF y 2 mL de HNO₃. Para el uso de estos micro-insertos de TFM en el sistema convencional de microondas, los contenedores se cargaron con 10 mL de agua ultrapura y se fijaron en una rejilla con 3 piezas en el interior. Después de cerrar estos recipientes, se fijó el rotor y se instaló una sonda para medir la temperatura (termopar, ATC-400-CE, Milestone, Tokio, Japón). El programa de temperaturas optimizado se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Programa de microondas utilizado para la digestión de las muestras.

Paso	Tiempo, minutos	Temperatura, °C	Potencia del MW, W
1	15	Temperatura ambiente hasta 90	1000
2	15	90 - 140	1000
3	15	140 - 200	1000
4	10	200	1000
5	60	Enfriar hasta temperatura ambiente	0

La solución digerida se recogió en frascos de polipropileno que se llenaron hasta 25 mL con agua ultrapura. Antes de la determinación cuantitativa, las muestras digeridas y los blancos analíticos se diluyeron 10 veces para reducir la concentración de HF (por debajo de 100 ppm) para evitar daños en el sistema de introducción de muestras de cuarzo y vidrio del ICP-MS.

Se realizó la limpieza de los micro-insertos de TFM utilizando 2 mL de HNO_3 al 50 % (v/v) y 25 μL de HF concentrado. Para la limpieza se siguió un programa de microondas que consistió en 10 minutos de calentamiento hasta 150 °C, 10 minutos de mantenimiento a 150 °C (potencia de microondas de 900 W en ambos pasos) y un paso de enfriamiento durante 60 minutos hasta llegar a la temperatura ambiente. A continuación, los insertos se aclararon con agua ultrapura y se secaron antes del siguiente paso.

Digestión enzimática para la extracción de nanopartículas de Ti

Se empleó la proteinasa K como enzima de extracción para alcanzar una solubilización completa de los tejidos hepáticos. De esta manera, se suspendieron 25 mg de tejido seco en 1.5 mL de solución enzimática recién preparada (3 mg/mL de proteinasa K, 0.5 % de SDS, 10 mmol/L de tampón TRIS, pH 7.4 a 8.2). La suspensión se sometió a un baño de ultrasonidos durante 1 hora y finalmente se agitó a 300 r.p.m. y 37 °C durante toda la noche. La solución de digestión enzimática se llenó con agua ultrapura hasta un volumen final de 2 mL. La solución final se analizó inmediatamente o se almacenó a 4 °C si fue necesario. Antes del análisis por SP-ICP-MS, la solución digerida se sonicó durante 5 minutos y se diluyó 10 veces en agua ultrapura.

Medición de los tejidos con el equipo SP-ICP-MS

Los tejidos digeridos enzimáticamente se midieron mediante SP-ICP-MS utilizando el sistema ICP-MS iCAP TQ de triple cuadrupolo en modo de detección de una sola partícula con el sistema estándar de introducción de muestras formado por una cámara de pulverización ciclónica y un nebulizador MicroMist de flujo óptimo de 0.4 mL/min. Para ello, el tiempo de integración se redujo a 5 ms con un tiempo de adquisición de 120 segundos por ejecución. El Ti se monitorizó a través del isótopo $^{47}\text{Ti}^+$ para evitar la interferencia del ^{48}Ca sobre el más abundante $^{48}\text{Ti}^+$. El Ti se midió en el desplazamiento de masas, utilizando O_2 como gas de reacción en la celda de

reacción para transformar el $^{47}\text{Ti}^+$ seleccionado en el primer cuadrupolo a $^{47}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, que se detecta tras seleccionar m/z 63 en el tercer cuadrupolo sin interferencias significativas.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se obtuvieron con un MET-JEOL-JEM-1011 (Tokio, Japón) operado a 100 kV. Las suspensiones de nanopartículas estándar de TiO_2 a una concentración de 1 mg/mL y el tejido hepático tratado enzimáticamente, fueron sonicados durante 5 minutos antes de la obtención de las imágenes TEM.

Resultados

Optimización del método de MW-AD

La optimización del método MW-AD se hizo utilizando el Ti como elemento objetivo de interés en este estudio.

- Evaluación de la mezcla de ácidos en la recuperación de nanopartículas de Ti

La baja disponibilidad de muestra, junto con las bajas concentraciones esperadas de los analitos en los tejidos, son los principales retos analíticos a los que hubo que prestar atención en el presente estudio. Teniendo en cuenta la matriz de la muestra y las propiedades del analito, se evaluaron dos métodos de digestión. El primero (sin adición de HF) adaptado de Taboada-López y cols. (344) no resultó adecuado. Las recuperaciones totales de Ti fueron de hasta el 60 %, pero los experimentos de adición de nanopartículas de TiO_2 dieron como resultado una recuperación inadecuada de alrededor del 15 % con una precisión pobre para las medidas realizadas (> 30 %).

Se añadió HF a la solución de digestión para mejorar la recuperación de las nanopartículas de TiO_2 adicionadas a la muestra. Se empleó una baja cantidad de HF concentrado (25 μL) sin embargo, la recuperación de las nanopartículas de TiO_2 fue todavía insuficiente (< 25 %). Además, se observó un aumento significativo de los blancos analíticos y de la contaminación cruzada, probablemente atribuido al uso de HF, que podría comprometer los límites de detección del método.

- Optimización de la digestión por MW utilizando micro-insertos de TFM

A la vista de los problemas asociados a la dilución de la muestra durante el MW-AD, se consideró una reducción del volumen total de digestión que permitiera un menor consumo de muestra y una menor dilución durante el tratamiento de esta. Por este motivo, se utilizaron los micro-insertos, ya que la masa y el volumen de la muestra se limitó a 0.1 g y 3 mL, respectivamente.

Inicialmente se utilizó 0.1 g de tejido seco y una solución de 1 mL de H_2O , 1 mL de HNO_3 , 0.5 mL de H_2O_2 y 25 μL de HF. El programa de calentamiento por microondas fue el mismo que el descrito en apartados previos. Con este protocolo se observó una reducción significativa de los blancos para todos los analitos al compararlos con los blancos obtenidos utilizando recipientes de TFM de 100 mL. Sin embargo, se observó una baja reproducibilidad, con unas RSDs de hasta el 30 %.

La escasa precisión observada para las mediciones de todos los analitos en las réplicas de la digestión de la muestra podría explicarse por las proyecciones de la muestra fuera de los recipientes de digestión debido a los gases formados durante la MW-AD, principalmente por el O_2 procedente de la descomposición del H_2O_2 . Para evitar los problemas relacionados con la sobrepresión dentro de los recipientes de digestión, se descartó el uso de H_2O_2 y se eligieron solo 2 mL de HNO_3 y 25 μL de HF para los experimentos posteriores. Utilizando esta estrategia, fue posible mejorar la

reproducibilidad del análisis, aumentar el rendimiento de las muestras (digestión simultánea de 15 muestras para cada ejecución) y reducir los blancos analíticos utilizando menores cantidades de ácidos, mejorando así los límites de detección (LODs). Este protocolo permitió obtener unos LODs que fueron de 0.370, 0.022 y 0.004 µg/L para el Al, el Ti y el V, respectivamente.

La optimización del programa de calentamiento del microondas también se llevó a cabo considerando la variedad de matrices de las muestras biológicas estudiadas en el presente trabajo. Para evitar proyecciones de la muestra debido a la rápida formación de vapores en los micro-insertos de TFM en la rampa de calentamiento inicial de 2 minutos, se ralentizó esta rampa, aumentando el tiempo a 10 minutos. Esta modificación fue suficiente para llevar a cabo el calentamiento del microondas para las muestras de cerebro, hígado, pulmón y bazo sin complicaciones. En el caso de las muestras de sangre, se observó una reacción con gran formación de espuma inmediatamente después de la adición del ácido nítrico concentrado, lo que provocó pérdidas parciales causadas por la proyección de la muestra. El problema se resolvió mediante la adición lenta de ácido nítrico concentrado (durante al menos una hora) antes de iniciar el programa de calentamiento de MW. Además, los pasos uno, dos y tres del programa de calentamiento de MW se ralentizaron aún más y se utilizaron 15 minutos para producir una reacción más controlada durante el calentamiento. En estas condiciones, se evaluó la reproducibilidad mediante las RSD de las mediciones de 5 réplicas de la muestra de hígado digerida y los resultados para todos los elementos oscilaron entre el 0.8 y el 24 % para todos los analitos. De acuerdo con la complejidad del material analizado, éstas pueden considerarse precisiones aceptables. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se aplicó el programa de calentamiento de MW optimizado que se muestra en la Tabla 17.

Extracción de nanopartículas de Ti de los tejidos de la rata y análisis mediante SP-ICP-MS

Dado que la presencia de nanopartículas de Ti era relativamente alta en las soluciones de blanco, incluyendo el agua ultrapura y los blancos de digestión, es importante minimizar su contribución al análisis, especialmente en el caso de las muestras cuyas concentraciones son extremadamente bajas. En este sentido, fue necesario realizar un lavado exhaustivo de las botellas de polipropileno en HNO_3 al 10 % durante la noche, desechando, como mínimo, 1 L de agua ultrapura antes de recoger la cantidad necesaria para el día, y filtrando los tampones utilizando filtros de corte de 3 kDa para tener una disminución significativa en los blancos obtenidos. Sin embargo, algunos reactivos, como las enzimas utilizadas para los tampones de digestión, no pueden someterse a ningún procedimiento de limpieza y tuvieron un impacto en las señales de fondo.

Para lograr una solubilización completa de los tejidos sin el uso de condiciones de ácido fuerte u oxidantes, se evaluaron diferentes enzimas. En primer lugar, una combinación de lipasa y pancreatina, utilizada por otros autores (342,344), dio lugar a una suspensión turbia con sólidos en suspensión que tuvo que ser filtrada o centrifugada antes del análisis SP-ICP-MS, provocando una importante pérdida de nanopartículas. En el estudio 5, se empleó una combinación de proteinasa K y SDS en tampón TRIS que consiguió hidrolizar los enlaces peptídicos y solubilizar los ácidos grasos y otros componentes de baja solubilidad del tejido. Gracias a esta combinación, fue posible obtener una solución homogénea, libre de materia sólida, evitando así la necesidad de filtrar o centrifugar las muestras antes del análisis por SP-ICP-MS. En la Figura 46 se puede ver una comparación visual de las suspensiones obtenidas por ambos métodos de digestión enzimática.

Tras seguir el segundo protocolo, en la Figura 47 se muestran las señales del blanco de digestión. Como se ha comentado anteriormente, el blanco de agua, tras tomar las

precauciones antes mencionadas, contenía solo unos 20 eventos de Ti. Sin embargo, el blanco de digestión que contenía la proteinasa K, el SDS y el tampón TRIS contenía un número significativo de eventos de Ti (146) con la distribución de masas que se muestra en el recuadro (Figura 48). La presencia de nanopartículas de Ti en este tampón podría atribuirse a la proteinasa K, que no pudo filtrarse utilizando los filtros de 3 kDa porque tiene un peso molecular de 28.9 kDa (345). El número de partículas tampoco pudo disminuirse utilizando diferentes fuentes comerciales de proteinasa K. Sin embargo, como se muestra en el histograma del recuadro de la Figura 48, la mayoría de las nanopartículas de Ti encontradas en este blanco representan 5 fg de Ti o menos, lo que está muy cerca del límite de detección, como se mostrará más adelante.

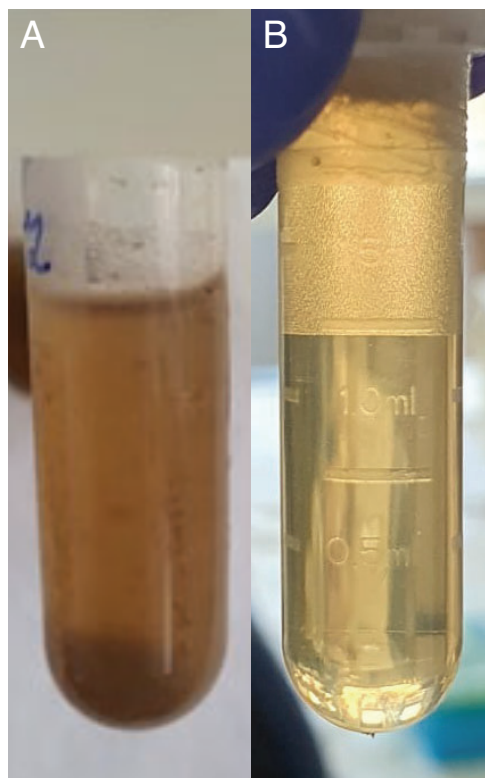


Figura 46. Fotografías que muestran (A) la suspensión resultante tras la digestión enzimática de una muestra de hígado utilizando el cóctel que contiene pancreatina y lipasa, y (B) la solución clara resultante obtenida tras la digestión enzimática utilizando proteinasa K y SDS en tampón Tris.

En la Figura 49 se puede observar una muestra de hígado digerida. El número de eventos (199) no es significativamente diferente al del blanco de digestión (146), lo que significa que la presencia de nanopartículas de Ti en este tejido, si es que hay alguna, es muy baja. Además, el aumento del fondo continuo (de 2 recuentos a 35 recuentos) revela la presencia de Ti en otras formas distintas a las nanopartículas (probablemente en forma iónica). El límite de detección del tamaño de las nanopartículas de TiO_2 en estas condiciones experimentales fue de 101 nm, lo que corresponde a 2.1 fg de TiO_2 por partícula.

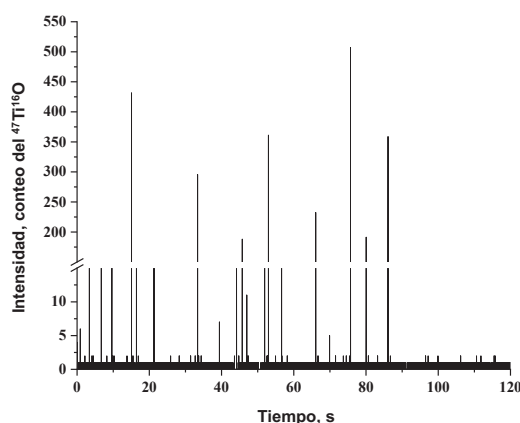


Figura 47. Señales brutas obtenidas para el Ti mediante el análisis SP-ICP-MS de agua ultrapura.

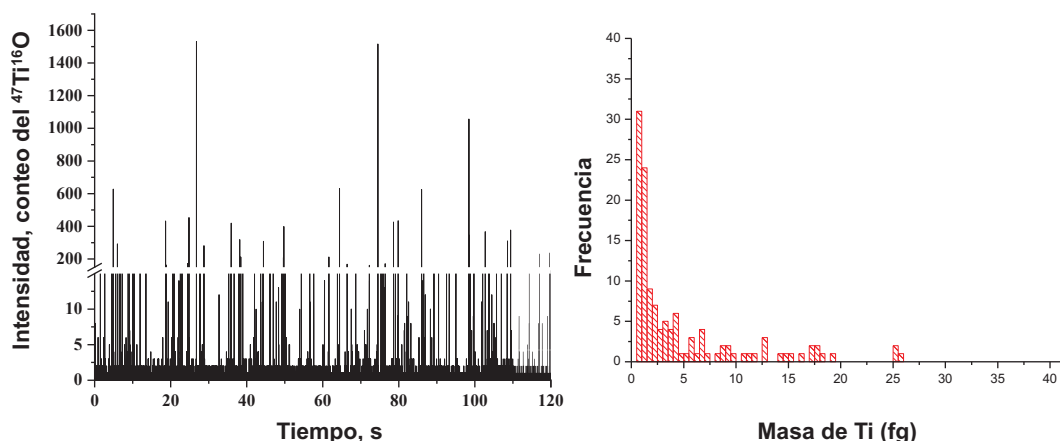


Figura 48. Señales brutas obtenidas para el Ti mediante el análisis SP-ICP-MS del blanco de la digestión enzimática. El histograma de la derecha representa la distribución de masas para cada muestra.

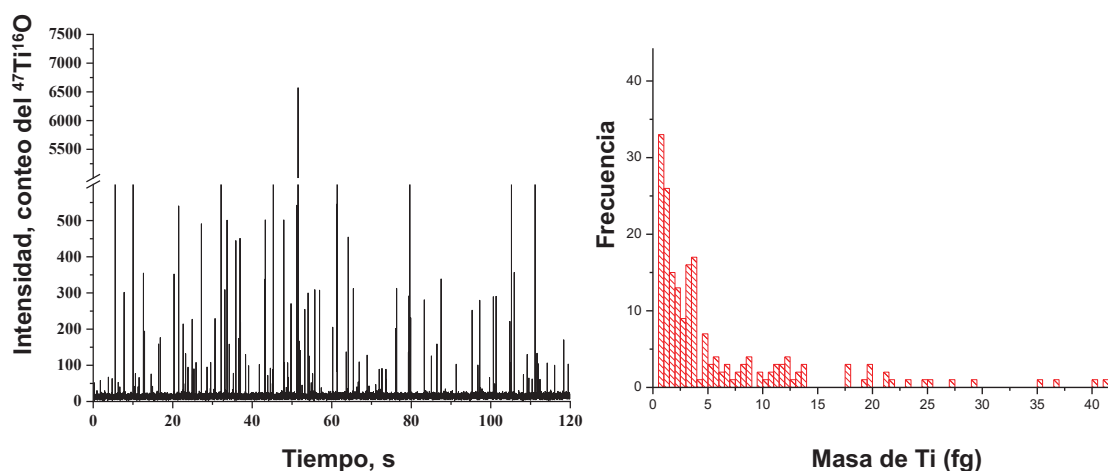


Figura 49. Señales brutas obtenidas para el Ti mediante el análisis SP-ICP-MS del hígado digerido enzimáticamente. El histograma de la derecha representa la distribución de masas para cada muestra.

Tras los cálculos apropiados mostrados en publicaciones anteriores (346), las intensidades de los eventos se transformaron en masa de Ti por evento mediante una calibración externa utilizando estándares de Ti elemental en forma iónica como se mencionó anteriormente. Después de obtener la masa de Ti en cada evento, los conjuntos de datos se trazaron como gráficos de caja y bigotes (boxplots) que se muestran en la Figura 50. Cada caja se construye como una fusión de dos digestiones independientes de la misma muestra (blanco, tratado o control), que no eran estadísticamente diferentes antes de ser fusionadas. La Figura 50 muestra una comparación de los fg de Ti en el blanco de digestión y los resultados obtenidos para cada órgano, comparando las muestras de las ratas del grupo control con las del grupo experimental. Algunos de los descriptores estadísticos se muestran con mayor precisión en la Tabla 18, incluyendo la media, la mediana, los cuartiles, la desviación típica y el número de eventos detectados. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de nanopartículas entre el grupo experimental y el grupo control en ninguno de los órganos estudiados.

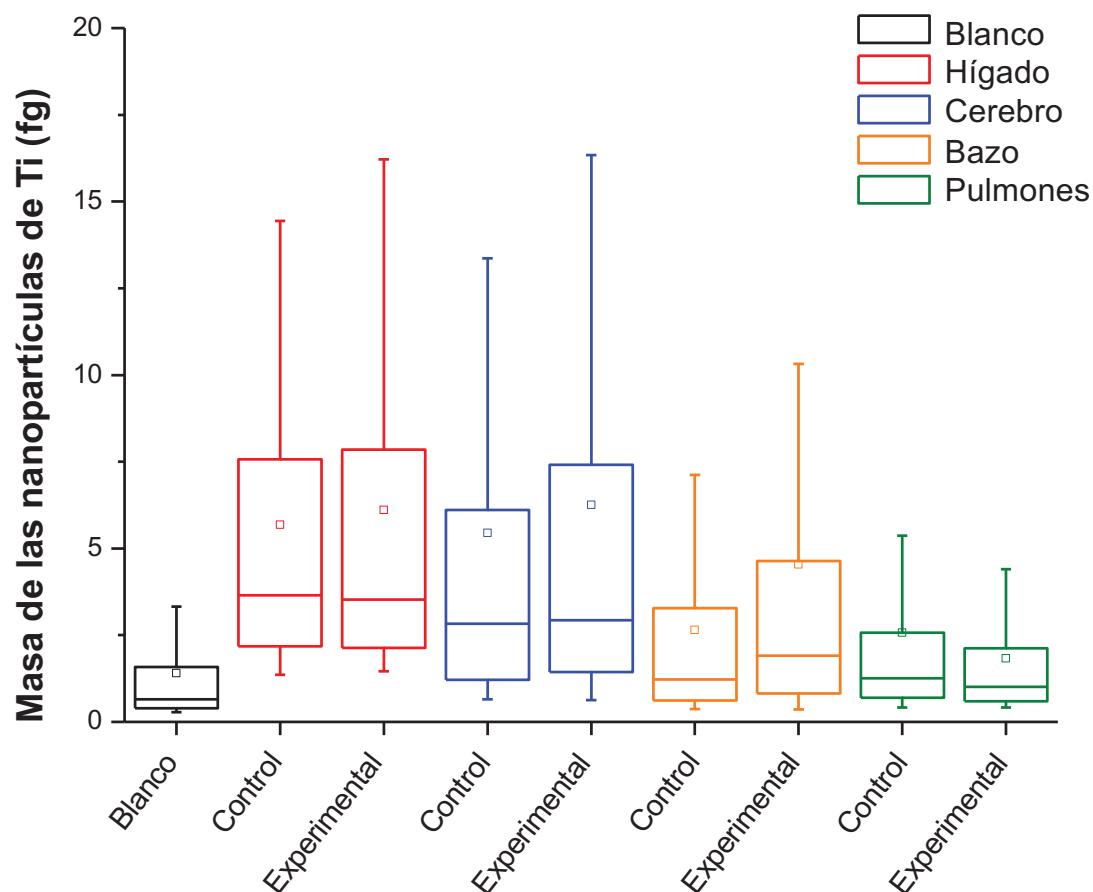


Figura 50. Gráficos de caja que muestran la distribución de la masa de las partículas encontradas en la digestión del blanco y de las muestras de hígado, cerebro, bazo y pulmones. Para cada órgano, la primera caja corresponde a un control de la rata, y la segunda caja corresponde a una rata experimental.

Aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, es posible observar que en las muestras de cerebro y de bazo (donde más cantidad de Ti se observó en la cuantificación total) el diagrama de caja correspondiente al grupo experimental tiene un recorrido intercuartílico mayor que los controles. Este hecho podría indicar la presencia de nanopartículas de Ti de un tamaño mayor (más fg de Ti por nanopartícula) en comparación con las nanopartículas presentes en las muestras control.

Tabla 18. Descriptores estadísticos de la distribución de la masa de los eventos encontrados en las muestras de hígado, cerebro, bazo y pulmones.

		Q1, fg	Q3, fg	Mediana, fg	Media, fg	DT, fg	# Eventos
Hígado	Blanco	0.39	1.60	0.65	1.40	2.00	300
	Control	2.19	7.57	3.66	5.68	5.11	126
	Experimental	2.13	7.84	3.53	6.11	5.88	223
Cerebro	Control	1.21	6.10	2.83	5.45	7.36	682
	Experimental	1.44	7.39	2.93	6.25	8.48	391
Bazo	Control	0.62	3.28	1.23	2.65	3.37	380
	Experimental	0.82	4.60	1.90	4.54	7.99	619
Pulmones	Control	0.70	2.57	1.26	2.58	4.55	446
	Experimental	0.59	2.12	1.01	1.83	2.05	519

La recuperación analítica global del método de extracción se evaluó añadiendo a una muestra de hígado (antes de la extracción) un estándar de nanopartículas de TiO_2 a una concentración de 80 ppb de Ti antes de la dilución con agua ultrapura. En la Figura 51 se muestran las señales brutas y su correspondiente histograma de masas. Como puede observarse, el número de eventos es significativamente mayor que en el blanco (1362 eventos frente a 160), mientras que la señal de fondo no aumenta significativamente.

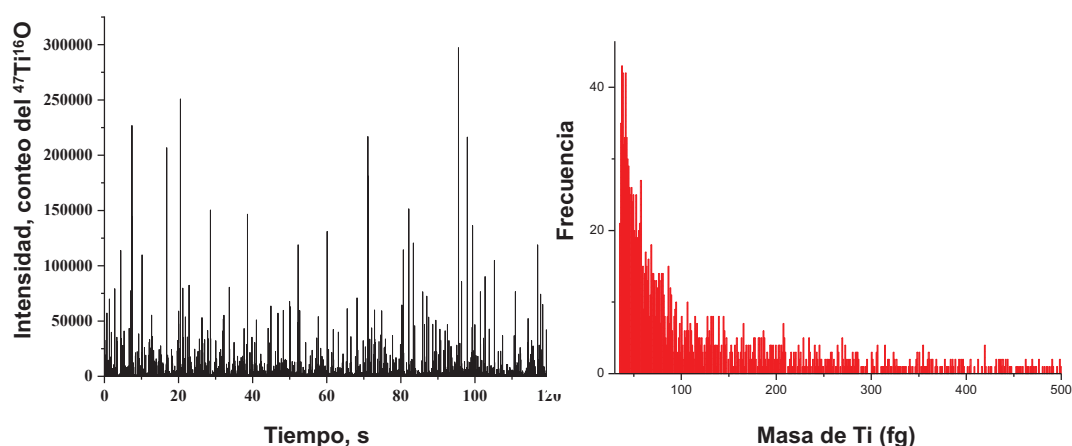


Figura 51. Señal bruta obtenida para el Ti mediante el análisis SP-ICP-MS de la muestra de hígado con digestión enzimática y previamente enriquecida con nanopartículas estándar de TiO_2 .

Las imágenes del TEM mostraron la presencia de pequeños agregados de partículas que podrían corresponderse a nanopartículas de Ti. Sin embargo, no fue posible llevar a cabo el análisis elemental de las muestras (Figura 52).

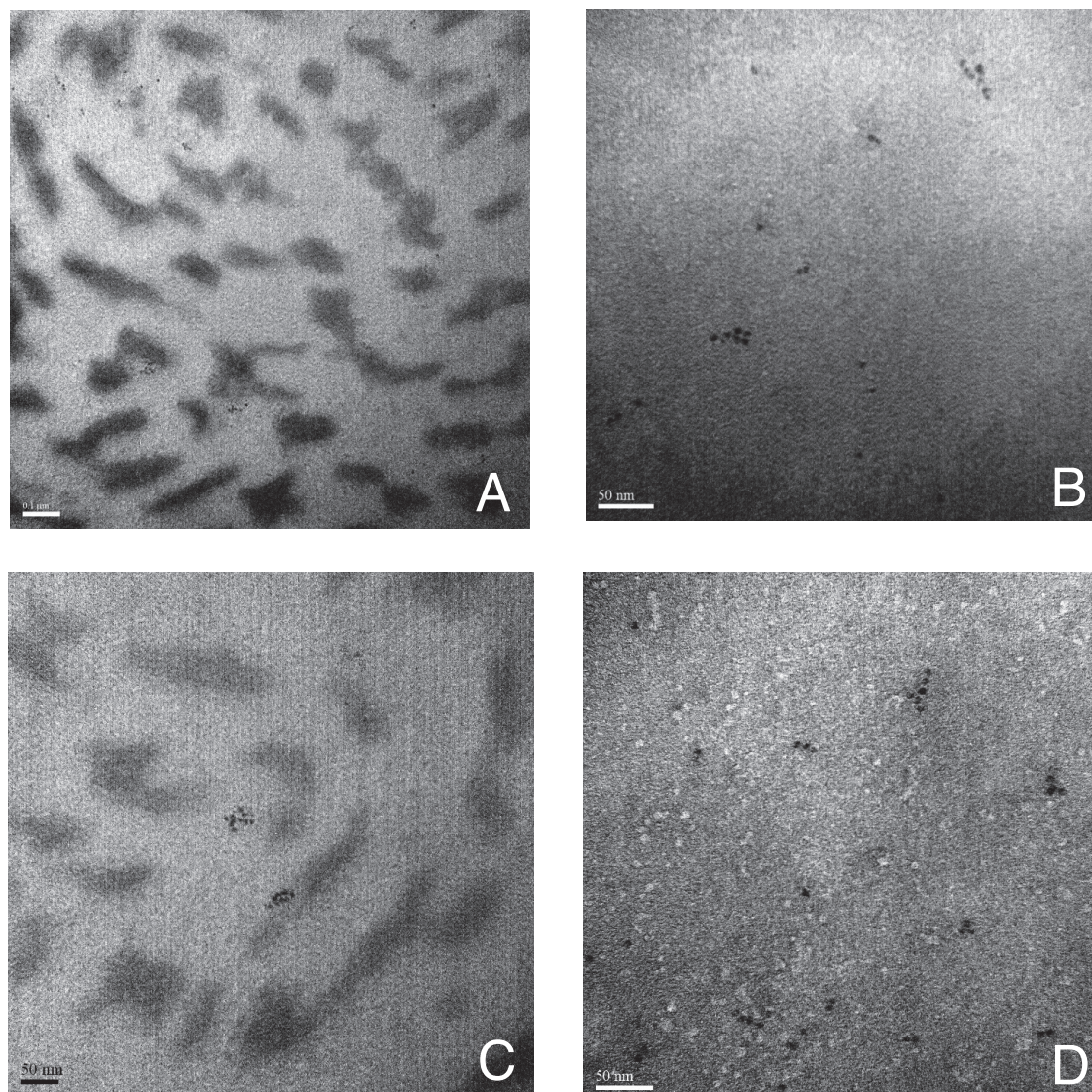


Figura 52. Imágenes TEM para nanopartículas estándar de TiO_2 preparadas por suspensión de polvo de TiO_2 en agua purificada (A-C) y muestra de hígado digerida enzimáticamente (B-D).

7. Discusión

La implantoplastia es una técnica de descontaminación mecánica que consiste en eliminar las espiras y en pulir y alisar las partes de la superficie rugosa del implante dental que se exponen a la cavidad bucal después de la cirugía periimplantaria resectiva o combinada (240,262,347,348). Por lo tanto, este procedimiento se lleva a cabo en zonas del implante que tienen un potencial de regeneración ósea limitado, es decir, en defectos óseos supracrestales y en dehiscencias periimplantarias. La implantoplastia tiene dos objetivos fundamentales: en primer lugar, eliminar el biofilm bacteriano y los depósitos de cálculo sobre el implante dental y, en segundo lugar, reducir la rugosidad superficial para dificultar la adhesión y el crecimiento bacteriano (256,349–351).

Se han descrito algunas desventajas y complicaciones relacionadas con esta técnica de descontaminación periimplantaria. Camps-Font y cols. (258) reportaron que la duración media del protocolo de implantoplastia en el laboratorio para un implante fue de 10 minutos y 37 segundos (DT = 55 segundos). Por lo tanto, esta técnica requiere de un tiempo relativamente alto para hacer un correcto pulido de la superficie implantológica. Además, tal y como se puede ver en la Figura 53, en la boca pueden haber zonas del implante dental que resulten difíciles o imposibles de pulir (266). Los inconvenientes de la implantoplastia se relacionan con el debilitamiento del implante dental debido al adelgazamiento de sus paredes, el daño térmico al hueso y a los tejidos circundantes causado por el aumento de temperatura del implante dental durante el fresado, o la liberación de partículas metálicas en el entorno periimplantario (268). Si bien diversos estudios *in vitro* ya han evaluado estos aspectos mecánicos (257,258,302,352–355) y térmicos (301,356,357), existen pocos trabajos en los que se analicen las partículas de Ti liberadas durante la implantoplastia (268,270). Estos residuos metálicos quedan incrustados en el hueso o en el tejido conectivo que circundan el implante dental y en muchas ocasiones son imposibles de retirar (Figura 54).

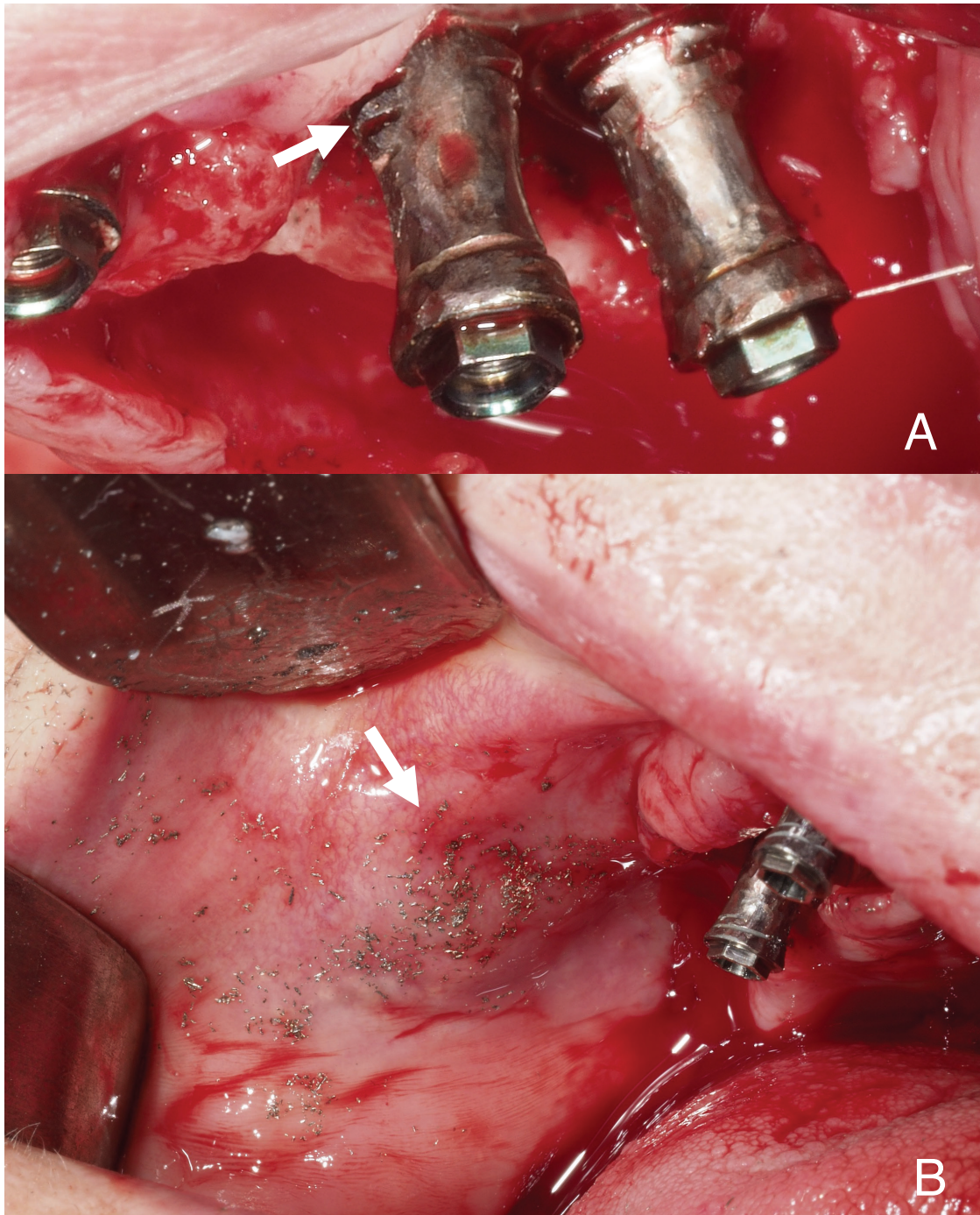


Figura 53. Implantoplastia de dos implantes dentales que presentan un defecto óseo periimplantario supracrestal. Se puede observar como hay zonas donde no se consiguió hacer un correcto pulido del implante (A) y como la implantoplastia genera partículas metálicas que se liberan en la boca del paciente (B).

Las investigaciones que componen la presente tesis doctoral han permitido evaluar la bioseguridad de la implantoplastia en el tratamiento de la periimplantitis gracias al análisis de las características fisicoquímicas y del comportamiento a la corrosión de las partículas de Ti liberadas durante este procedimiento. Además, también se ha estudiado la respuesta biológica inducida por los residuos metálicos de la implantoplastia a través de ensayos celulares y un modelo experimental en rata en el que se ha analizado la translocación de iones y nanopartículas metálicas, así como la reacción tisular local inducida por estas partículas de Ti6Al4V. En todos los estudios se utilizaron implantes dentales Avinent Coral® (Avinent, Santpedor, España). Estos dispositivos están fabricados con Ti de grado V (Ti6Al4V) y con la superficie Biomimetic® que se crea mediante un arenado con óxido de aluminio y una anodización con una solución electrolítica rica en calcio y fósforo.

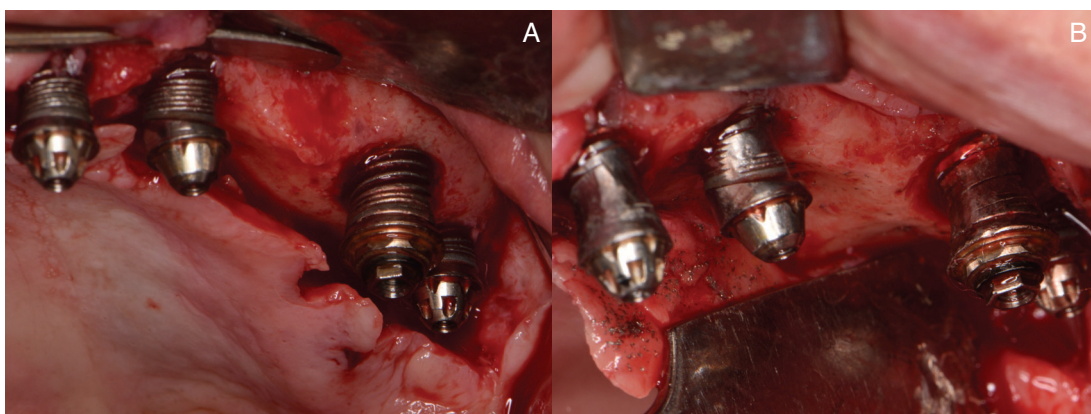


Figura 54. Imagen clínica de una cirugía resectiva periimplantaria (A). Se llevó a cabo la implantoplastia del componente supracrestal de los implantes (B). Se puede observar como hay numerosas partículas de metal en el interior del colgajo y en el hueso.

Los resultados parecen indicar que las partículas de Ti6Al4V liberadas durante la implantoplastia son menos resistentes a los fenómenos de corrosión, liberan una mayor cantidad de iones de V e inducen una reacción pro-inflamatoria. Además, en los estudios en modelo animal se ha comprobado que hubo una translocación de iones y posiblemente de nanopartículas metálicas a órganos alejados al defecto óseo, y que a

nivel local estas partículas metálicas provocaron una reacción inflamatoria a cuerpo extraño. Por lo tanto, se aceptó la hipótesis principal de la presente tesis doctoral.

- **Objetivo específico₁: Evaluar las propiedades fisicoquímicas y la citotoxicidad de las partículas metálicas de Ti en aleación liberadas durante la implantoplastia.**

Estudiar la superficie específica de los residuos metálicos generados durante la implantoplastia permite determinar la superficie real de la partícula metálica que está en contacto con el medio fisiológico. A mayores valores de superficie específica existe una mayor área con la que puede interaccionar la partícula y el entorno periimplantario (358). En nuestro caso, las partículas metálicas generadas por la implantoplastia presentaron una superficie específica que osciló entre 0.2 y 0.4 m² / g. Este rango de valores se debe a los distintos tamaños de partícula y a la morfología irregular de la muestra.

Recientemente Callejas y cols. (359) caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de las partículas de Ti que se liberan durante la inserción de implantes dentales Klockner® (Vega plus, Klockner, Escaldes Engordany, Andorra). Los autores reportaron que las partículas más pequeñas de Ti, aquellas de 5 µm, tenían una superficie específica (0.49 ± 0.0037 m² / g) mayor que el Ti de 30 µm (0.21 ± 0.0009 m² / g). En base a estos resultados, parece que los residuos metálicos liberados durante la inserción del implante dental y durante la implantoplastia tienen unos valores similares de superficie específica. Sin embargo, las partículas de metal generadas durante la implantoplastia probablemente provoquen una reacción local más agresiva ya que durante este procedimiento se libera una mayor cantidad de residuos. Además, la inserción del implante dental provoca un desprendimiento de partículas de Ti en la parte más

coronal del hueso mientras que durante la implantoplastia las partículas metálicas quedan incrustadas también en el tejido conectivo (307,359).

Los valores de superficie específica están relacionados con el tamaño y la morfología de los residuos metálicos (360,361). Respecto al tamaño de la partícula de la muestra estudiada, los ensayos de granulometría pusieron de relieve que los residuos metálicos de Ti6Al4V generados durante la implantoplastia de implantes Avinent Coral® (Avinent Implant System, Santpedor, España) tenían un tamaño que osciló entre los 6–1850 μm . Por otro lado, Wu y cols. (362) también analizaron algunos parámetros fisicoquímicos de las partículas de metal liberadas después de pulir la superficie de tres sistemas de implantes diferentes; BioHorizons® (Alabama, EE. UU.), Straumann® (Basel, Suiza) y Zimvie® (Florida, EE. UU.). Estos autores reportaron que la mayoría de las partículas obtenidas tenían un tamaño ultrafino <100 nm por lo que pueden pasar desapercibidas en el campo quirúrgico.

En esta línea, también se ha reportado que durante la implantoplastia se liberan micropartículas y nanopartículas (<100 nm) de Ti o Ti en aleación (363). Parece que, aunque se aplique el mismo protocolo de fresado, se libera una mayor concentración de nanopartículas cuando se pule la superficie de los implantes BioHorizons® (Alabama, EE. UU.) en comparación con los implantes Straumann® (Basel, Suiza) y Zimvie® (Florida, EE. UU.). Este hecho es debido a que los implantes con una mayor dureza desprenden partículas metálicas de menor tamaño (362,363). Sin embargo, si comparamos los valores de dureza que se muestran en la Tabla 19 cabría esperar un menor tamaño de partícula en nuestra muestra. Las diferencias entre los resultados de estas publicaciones (362,363) y el estudio 1 podrían deberse al método de recogida de las partículas, al protocolo de fresas, al tratamiento superficial implantológico, al material del implante y/o a la dureza del implante (Tablas 4 y 19).

Tabla 19. Características de los implantes analizados en distintas publicaciones sobre la implantoplastia (362,363).

	Material	Superficie	Dureza (GPa)
BioHorizons ®	Ti6Al4V	Laser-Lok	1.95 (137)
Straumann ®	Ti c.p.	SLA	1.12 (198)
Zimvie ®	Ti c.p.	MTX	1.45 (233)
Avinent ®	Ti6Al4V	Biomimetic	2.28 (440)

La morfología del material también tiene un impacto en la interacción entre éste y el hospedador. En las micrografías obtenidas por SEM se detectaron esferas de TiO_2 . Estas esferas son el resultado de la repasivación de algunas de las partículas de Ti cuando se exponen al oxígeno (364). Las partículas con forma esférica presentan una menor superficie específica, y, por lo tanto, una menor interacción con los tejidos. Sin embargo, tal y como puede observarse en la Figura 55, la mayoría de las partículas metálicas generadas por implantoplastia presentan claros signos de deformación plástica y una morfología irregular con forma de escama. Estos resultados coinciden con las imágenes de SEM publicadas por varios autores que también han estudiado los residuos metálicos liberados durante la implantoplastia (362,363,365). Además, a mayor aumento las micrografías revelaron que las partículas metálicas de nuestra muestra presentaban las microestructuras en placa de Widmanstätten de la aleación Ti6Al4V que indican que el material ha absorbido una gran deformación (326).

Por otro lado, se analizó la composición química de la muestra y se determinó su estructura cristalina. Sobre la superficie de las partículas de Ti no se encontraron trazas de las fresas de carburo de tungsteno que se utilizaron para el fresado del implante. Lozano y cols. (365) emplearon el mismo protocolo de fresado que en el estudio 1 y tampoco observaron restos de contaminantes provenientes de las fresas. Esto puede ser debido a que las fresas de carburo de tungsteno tienen una dureza superior al Ti c.p. y al Ti6Al4V. Además, estas fresas se renovaban después de cada implante por lo que su desgaste era mínimo. En cambio, sí se detectaron restos de la

fresa de carburo de silicio, que clínicamente se descompone muy fácil y rápido. No obstante, estos restos no estaban sobre la superficie de las partículas metálicas liberadas durante el fresado del implante, por lo que pueden ser más sencillas de remover del campo quirúrgico.

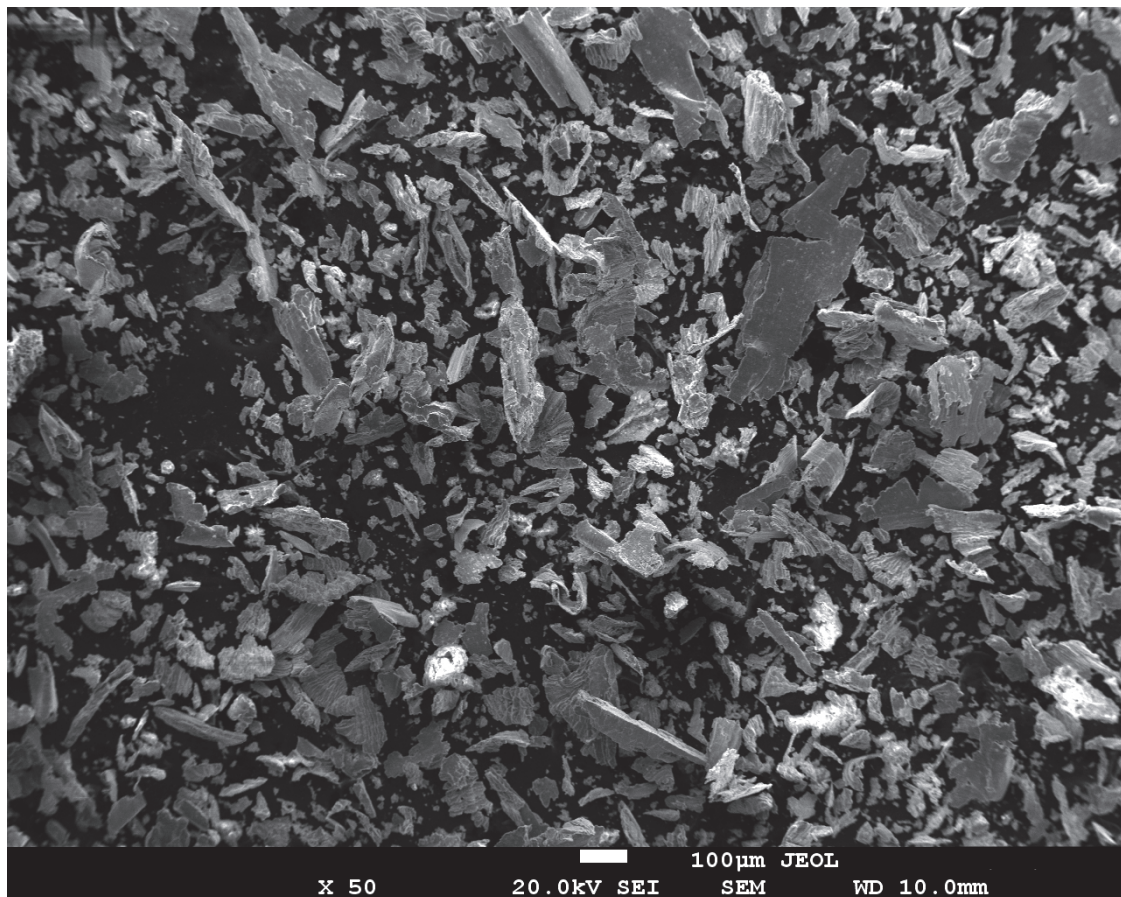


Figura 55. Imagen de microscopía electrónica de barrido a x 50 de aumento. Se puede observar que las partículas tenían distinto tamaño de partícula y una morfología irregular con forma de escamas.

Respecto a la estructura cristalina, las partículas estudiadas presentaron una aleación de Ti $\alpha+\beta$ donde mayoritariamente había la fase α mientras que solo el 5 % era la fase β . Como ya se ha explicado en el apartado de propiedades mecánicas del Ti, la fase β otorga buenas propiedades mecánicas a la aleación y se estabiliza gracias al V (27).

Uno de los objetivos del estudio 1 fue determinar la liberación de iones de las partículas de Ti6Al4V que se desprenden durante la implantoplastia. En este ensayo se comprobó que la liberación de iones V fue superior en comparación con los iones Ti y Al. Los sistemas metálicos en contacto con un medio fisiológico liberan iones para intentar alcanzar la constante de solubilidad del sistema. En general en las primeras horas hay un desprendimiento de iones metálicos con una cinética muy rápida. Posteriormente se reduce y se estabiliza esta liberación de iones por lo que se consigue mantener una meseta plana y prácticamente constante en la curva (366,367). En el estudio 1 se comprobó que el Ti y el Al responden a este modelo, pero no así el V. La liberación de iones V no mostró signos de estabilización durante el periodo de estudio y fue significativamente mayor que la liberación de iones Ti y Al. Nuestros resultados coinciden con los hallazgos encontrados por Barrak y cols. (363) ya que también observaron que la muestra de partículas metálicas generadas durante la implantoplastia liberaban una mayor concentración de iones V (0.12 ± 0.023 ppm) en comparación con la producción de iones de Ti y Al, que fue mínima. Este fenómeno podría explicarse por la solubilidad del V (368–370). Las implicaciones de esta rápida y acentuada liberación de iones V sin saturación a lo largo del tiempo no está clara. Aun así, está claro que es un efecto indeseable que podría indicar la degradación de la aleación.

La liberación de iones también parece estar condicionada por el tamaño de la partícula. De hecho, se ha comprobado que las partículas de Ti de 5 μm liberan una mayor cantidad de iones (800 ± 18 ppb) que aquellas más grandes (30 μm , 625 ± 10 ppb) (361).

Una de las principales preocupaciones relacionadas con la implantoplastia es la pérdida de la biocompatibilidad del implante dental pulido que queda en boca o la toxicidad de las partículas metálicas que se desprenden durante el procedimiento

(268). Se ha sugerido que los procesos de fresado pueden modificar las características fisicoquímicas de la superficie del implante y consecuentemente afectar la adhesión de las células y su biocompatibilidad (269). La mayoría de las revisiones sistemáticas sobre la implantoplastia concluyen que es una técnica segura que no disminuye la biocompatibilidad del implante y no genera efectos adversos biológicos importantes (268–270). Sin embargo, llama la atención la escasez de estudios primarios que evalúen las consecuencias de la liberación de partículas de Ti durante la implantoplastia en el entorno periimplantario y en el resto del organismo.

Schwarz y cols. (371) evaluaron la viabilidad de una línea celular de fibroblastos gingivales mediante el análisis de la actividad de la adenosina trifosfato. Los autores observaron que la superficie pulida resultante de practicar la implantoplastia a implantes Straumann® (Basel, Suiza) permitía el crecimiento y la viabilidad celular de estas células. Según estos mismos autores, aunque la implantoplastia implica ligeras modificaciones en los elementos que componen la superficie del implante, la composición de su superficie es equiparable a la de un implante mecanizado. Ambas superficies presentaron unas concentraciones parecidas de carbono, oxígeno, sodio, cloro, potasio, silicio, pero hubo diferencias estadísticamente significativas en la concentración de nitrógeno (6.3 ± 6.2 en el implante mecanizado vs. 13.9 ± 5.3 en la superficie con implantoplastia), Ti (84.8 ± 12.4 en el implante mecanizado vs. 76.7 ± 10.0 en la superficie con implantoplastia) y de Al (en un implante mecanizado no hay presencia de Al, mientras que en la superficie con implantoplastia se detectó 0.7 ± 1.0 de Al).

Parece que las superficies más lisas mejoran el crecimiento inicial de los fibroblastos gingivales humanos (372); sin embargo, estos trabajos ignoran el efecto de las partículas que se generan al pulir el implante. En este sentido el estudio 1 pone de relieve que las partículas metálicas que se liberan durante el fresado del implante

dental provocan una reducción significativa de la viabilidad celular en los fibroblastos humanos. Estos hallazgos coinciden con los resultados previamente publicados por Barrak y cols. (363) y Schwarz y cols. (373) donde las partículas de Ti con un tamaño entre 60-100 nm provocaron una disminución de la viabilidad celular de las células HFF. En el estudio de Barrak y cols. (363) se utilizaron partículas obtenidas por la implantoplastia de implantes de Ti6Al4V (BioHorizons®, Alabama, EE. UU.), mientras que en el trabajo de Schwarz y cols. (373) las partículas de Ti c.p. no se obtuvieron por implantoplastia si no que se obtuvieron de un proveedor.

También se ha estudiado la viabilidad de los osteoblastos SAOS-2 en la superficie de un implante con implantoplastia. Un estudio in vitro demostró que la superficie de un implante con implantoplastia permite el crecimiento y la proliferación de SAOS-2, y que además esta superficie pulida no afecta a la producción de marcadores relacionados con su actividad como la ALP, la OPG y la OC (374). No obstante, y tal y como hemos visto en el caso de los fibroblastos, este trabajo no analizó el efecto de las partículas metálicas desprendidas durante este procedimiento.

En el estudio 1 las partículas de Ti6Al4V generadas por implantoplastia provocaron una disminución de la viabilidad celular en SAOS-2 en el extracto sin diluir, pero no en el resto de los extractos. De forma parecida, en un estudio de Schwarz y cols. (373) se reportó que las partículas de Ti c.p. provocan una disminución progresiva de la viabilidad celular de la línea SAOS-2. Estos ensayos celulares se llevan a cabo de acuerdo con la norma ISO 10993-5 (Evaluación biológica de dispositivos médicos – Parte 5: Pruebas de citotoxicidad in vitro) en la que se establece que se deben diluir los extractos a concentraciones 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000.

Los resultados de estas publicaciones ponen de relieve que para evaluar la toxicidad de la implantoplastia no es suficiente analizar el implante dental que permanece en

boca. Las partículas metálicas que se liberan durante esta técnica de descontaminación pueden tener un efecto perjudicial en la viabilidad de las células del tejido periimplantario. Estos residuos metálicos poseen unas características fisicoquímicas (p.ej., ángulo de contacto, energía de superficie, superficie específica, propiedades mecánicas, etc.) que provocan que sean más reactivas en el entorno biológico, y generalmente más citotóxicas en comparación con la superficie de un implante dental (ya sea pulido o no). En resumen, los ensayos llevados a cabo en el estudio 1 permiten aceptar la hipótesis específica₁, es decir, que la implantoplastia altera las características fisicoquímicas del Ti y genera partículas metálicas que son citotóxicas para los osteoblastos y los fibroblastos.

- **Objetivo específico₂: Determinar las propiedades mecánicas y la resistencia a la corrosión de las partículas metálicas liberadas durante la implantoplastia**

Respecto al objetivo específico₂ los resultados de los ensayos de nanoindentación demostraron que las partículas de Ti6Al4V procedentes de la implantoplastia eran más duras que el implante original, probablemente debido al estrés aplicado durante el fresado del implante. Durante el mecanizado de un metal (proceso de fresado como la implantoplastia) los defectos en la red cristalina del material aumentan la dureza del metal hasta el punto de que no puede absorber más energía, lo que provoca su fractura en esos puntos. De este modo, estas partículas tienen una energía interna mucho mayor que el resto del implante dental (375). Este hecho, puede observarse habitualmente en la cabeza de los clavos, que se corroen más en la zona de golpeo con el martillo debido a que la aplicación de tensión genera defectos en la estructura cristalina y esta energía tiende a ser liberada por reacción química.

De acuerdo con las leyes de la termodinámica, las partículas de la implantoplastia deben liberar esta energía que han absorbido durante el fresado del implante (367). Por lo tanto, desde un punto de vista teórico estas partículas metálicas pueden ser más susceptibles a la corrosión electroquímica. Por este motivo estudiar la resistencia a la corrosión de las partículas metálicas de la implantoplastia es importante para conocer el comportamiento que pueden tener en el entorno periimplantario dentro de la cavidad bucal.

Los procesos corrosivos pueden clasificarse en función del mecanismo de ataque en corrosión seca/química o húmeda/electroquímica. La diferencia entre ambas es que en la corrosión seca/química no hay electrolito, mientras que en la corrosión húmeda/electroquímica sí. Debido a que en el cuerpo humano siempre hay un medio acuoso (p. ej., saliva, sangre, medio extracelular, etc.) alrededor del biomaterial metálico, los fenómenos que ocurren están relacionados con la corrosión húmeda o electroquímica (376).

La corrosión húmeda se define como el deterioro de un metal y sus propiedades como consecuencia de una reacción electroquímica de oxidación-reducción entre el metal y su medio (377). Para los procesos de corrosión debe haber dos electrodos (ánodo y cátodo), y un electrolito como medio conductor. En el ánodo ocurre un proceso de oxidación o reacción anódica donde el metal libera electrones, es decir, el metal se corroe y libera iones al medio. Por otro lado, el cátodo sufre un proceso de reducción donde el metal al ser más noble no se corroe. Los electrones del ánodo se captan mediante un oxidante presente en el electrolito. En medios ácidos el oxidante es el H^+ , mientras que en medios neutros o alcalinos es el O_2 . Actualmente, para el estudio del comportamiento a la corrosión se utilizan electrodos de referencia que tienen un potencial de equilibrio estable y conocido. En el estudio 2 el electrodo de referencia que

se utilizó para los ensayos de medida de potencial de circuito abierto y los ensayos potenciodinámicos fue un electrodo de calomelanos (KCl saturado), con un potencial de 0.241 V.

En la Figura 56 se encuentran las ecuaciones de las reacciones básicas de oxidación (A) y reducción (B):

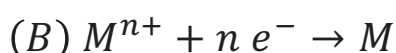


Figura 56. Ecuaciones que representan la reacción básica de oxidación (A) y reducción (B). M: elemento químico; n: número; e: electrón.

En la cavidad bucal todos los dispositivos metálicos están en contacto en mayor o en menor medida con la saliva. La saliva está compuesta por un 99 % de agua en la que se disuelven un 1 % de sales minerales y algunas proteínas plasmáticas. Este medio acuoso desarrolla un importante papel buffer para equilibrar el pH. En condiciones normales el pH salival oscila entre 6 y 7.7, aunque pueden existir importantes variaciones debido a diversos factores como el efecto de los productos bacterianos, la disminución del flujo salival, o bien, la ingesta de ciertos alimentos o medicamentos. Las propiedades electroquímicas de la saliva dependen de su composición, pH y tensión superficial (378,379).

Existen diversos factores que influyen en los procesos de corrosión como, por ejemplo, las características del biomaterial (composición química, potencial electroquímico, microestructura, etc.), la cantidad de oxígeno en el medio y la temperatura (34). El Ti del implante dental puede corroerse por el ataque químico proveniente del metabolismo bacteriano, por las soluciones de flúor que se encuentran en las pastas dentífricas o los enjuagues bucales, o bien, por un pH salival ácido provocado por la

ingesta de ciertos alimentos (379,380). Por otra parte, los macrófagos también pueden favorecer la corrosión del metal ya que pueden liberar H_2O_2 sobre la superficie del implante y favorecer la disolución de la capa de pasivado del Ti (381,382).

Por lo tanto, la cavidad bucal representa un ambiente hostil para cualquier implante dental o biomaterial metálico. Estos dispositivos se exponen a un medio húmedo en el que pueden acontecer distintos procesos electroquímicos (331). Según Gittens y cols. (383) los tipos de corrosión más frecuentes en el cuerpo humano son los siguientes:

- Corrosión galvánica: ocurre por el contacto directo entre dos metales diferentes inmersos en un electrolito. La diferencia entre el potencial electroquímico de los dos metales provoca la oxidación del metal anódico ya que tiene una menor capacidad de reducción (383). En implantología bucal se puede crear una pila electroquímica cuando se conecta al implante dental una supraestructura de un metal menos noble, como por ejemplo Cr-Co (384,385). Sin embargo, el uso de aditamentos de Ti o de otros metales nobles puede reducir su aparición.
- Corrosión por picadura: ocurre como consecuencia de la ruptura espontánea de la capa protectora de óxido. Es una forma localizada de corrosión que penetra hacia el interior del metal (383).

El implante dental también puede sufrir un desgaste mecánico como consecuencia del rozamiento con el hueso durante su colocación, por el micro-movimiento entre el implante dental y su aditamento, o bien, por el efecto de las fresas o las curetas utilizadas durante la descontaminación mecánica del implante dental (43). Este fenómeno de desgaste mecánico conlleva la liberación de partículas metálicas y a la pérdida de la película de óxido sobre la superficie del implante, lo que a su vez

provoca que el material sea más susceptible a la corrosión electroquímica (383,386). Por otro lado, la tribocorrosión es el término que se emplea cuando se producen de forma simultánea sobre el implante fenómenos de desgaste mecánico y de corrosión electroquímica. Diversas publicaciones han comprobado que los implantes dentales son susceptibles a sufrir fenómenos de tribocorrosión (38,40,43,387).

Respecto a la descontaminación del implante dental con periimplantitis, la mayoría de los autores recomiendan el uso de terapias “radicales”, es decir, tratamientos que son muy agresivos para la superficie del implante dental como la implantoplastia o los cepillos de Ti. Kotsakis y cols. (388) compararon distintos métodos de descontaminación, como el cepillo de Ti, de Nylon y un sistema de agua a presión, y determinaron la resistencia a la corrosión y la disolución del Ti. Los resultados de este interesante estudio ponen de relieve que los métodos de descontaminación mecánica más agresivos modifican la superficie del implante dental, lo que provoca una disminución de las propiedades osteoconductivas del material. Además, producen una mayor liberación de productos de disolución del Ti.

Los hallazgos del estudio 2 permiten aceptar la hipótesis específica₂ ya que muestran que las partículas de la implantoplastia tienen una resistencia a la corrosión menor que el material control. Este hecho seguramente es debido al estrés residual provocado por el fresado de la implantoplastia y por la pérdida de la capa de pasivación del metal (365). Estos resultados se corroboraron en una reciente publicación de Lozano y cols. (365) en la que se evaluó la resistencia a la corrosión de tres muestras distintas correspondientes a la superficie de un implante dental sometido a implantoplastia, a las partículas generadas durante este procedimiento y a la superficie sin modificar de un implante (control). Los autores reportaron que las partículas generadas por implantoplastia presentaban los peores valores de resistencia a la corrosión, seguidas del implante con implantoplastia y por último el implante sin modificar. Lozano y cols.

(365) utilizaron el mismo protocolo de implantoplastia que en el estudio 2, sin embargo ellos llevaron a cabo el análisis de la resistencia a la corrosión con implantes Klockner Vega ® (Escaldes Engordany, Andorra) que están fabricados de Ti c.p. y presentan la superficie contacTi. A pesar de que se analizaron distintos implantes dentales, es importante destacar que los parámetros estudiados de corrosión fueron muy similares entre el estudio 2 y el trabajo de Lozano y cols. (365) lo que sugiere que nuestros resultados podrían ser extrapolables a implantes de Ti o de Ti en aleación de otras casas comerciales.

Ya se ha comentado que la corrosión por picadura implica la pérdida de la capa de óxido de pasivación en un punto muy concreto a partir del cual el metal puede degradarse. En las imágenes de SEM del estudio 2 (Figura 36) y del trabajo de Lozano y cols. (365) se observaron picaduras en la superficie de las muestras de las partículas metálicas generadas durante la implantoplastia. De forma parecida, se ha visto corrosión por picaduras en las prótesis articulares después de ser retiradas (389). Estos fenómenos corrosivos podrían explicar la liberación de iones desde el metal al medio y la degradación del implante dental u ortopédico.

Por otro lado, la presencia de otros metales o aleaciones en la cavidad bucal, como los alambres de ortodoncia, brackets, prótesis metálicas, etc. provocan que haya una mayor cantidad de iones metálicos conectados a través de un electrolito (la saliva) y, por lo tanto, se favorezca los fenómenos de corrosión galvánica. Por este motivo, en la cavidad bucal se debe controlar la cantidad y la naturaleza de los materiales metálicos introducidos. De hecho, con el objetivo de crear el mínimo efecto “pila” y por lo tanto, para evitar la corrosión electroquímica por pares galvánicos, se deben introducir metales idénticos o lo más similares posible (383,390).

En este punto, se deben diferenciar dos aspectos. El primer aspecto es que la reacción electroquímica genera productos de corrosión que en general son óxidos mixtos de Ti que pueden provocar citotoxicidad (391,392). El segundo aspecto que se debe considerar es que los fenómenos de corrosión favorecen la degradación del metal por lo que se liberan iones al medio que pueden acumularse en órganos y tejidos. Además, la probabilidad de que se liberen iones se incrementa por la propia naturaleza del material particulado ya que a mayor superficie específica, existe una mayor liberación de iones (393). La distribución de la forma iónica y nanoparticulada del Ti, el Al y el V en un organismo vivo se ha evaluado en el estudio 4, y sus resultados se discutirán en los próximos apartados.

- **Objetivo específico₃: Analizar la respuesta inflamatoria y osteogénica inducida por las partículas metálicas liberadas durante la implantoplastia.**

El sistema inmune es una red de células, tejidos y órganos que trabajan de forma conjunta para proteger al organismo frente a cuerpos extraños o patógenos externos. Su mecanismo de acción se produce a través de barreras físicas como la piel o las mucosas, pero también a partir de células, citoquinas, factores de crecimiento, entre otros. Los procesos celulares y moleculares que componen el sistema inmune son complejos y no se pretende describirlos en su totalidad, pero sí lo suficiente para entender qué respuesta inmunológica provocan las partículas de Ti liberadas en el entorno periimplantario.

La primera línea de defensa contra materiales extraños, infecciones e incursiones estériles (p. ej., traumatismo, cáncer, isquemia o alteraciones metabólicas) es el sistema inmune innato que proporciona una respuesta inmediata y no específica (394–396). El sistema inmune innato se encarga de regular la inflamación aguda inducida

por microorganismos o daño celular. Además, este sistema es importante para la ulterior activación de la respuesta inmune adaptativa (397).

Para que se inicie la respuesta inmune innata las células deben reconocer el agente disruptivo (microorganismos, cuerpos extraños, etc.). Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) son proteínas capaces de detectar moléculas que se encuentran en los patógenos (patrones moleculares asociados a patógenos – PAMPs), o moléculas liberadas por células dañadas (patrones moleculares asociados a daños – DAMPs) (397,398). Existen cuatro subfamilias de las PRR; los receptores tipo Toll (TLR), receptores de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD/NLR), receptores de lectina tipo C (CLR) y receptores similares al gen inducible por el ácido retinoico 1 (RIG-1/RLR) (397,399).

Los TLR son proteínas transmembrana que se encuentran en los tejidos periodontales y periimplantarios y activan la respuesta inmune innata mediante su unión con componentes bacterianos como el LPS, el DNA bacteriano, el peptidoglicano, etc. Diversos estudios han descrito el papel del TLR-2 y el TLR-4 en el reconocimiento de ciertos periodontopatógenos (400). A través de los TLR se desarrolla una cascada intracelular que conlleva la activación de factores de transcripción y la subsecuente expresión de citoquinas inflamatorias (TNF α , IL1 β , IL6), la migración de leucocitos y la activación de la osteoclastogénesis (401,402). La vía de activación de los TLRs es posiblemente la más estudiada en la patogenia de las enfermedades periodontales y periimplantarias; sin embargo, también se ha relacionado la vía de los inflamasomas en la activación del sistema inmune innato mediado por bacterias (403–407).

Los inflamasomas son complejos intracelulares multiproteicos compuestos por un sensor y una caspasa inflamatoria conectada a una proteína adaptadora. La vía de los

inflammasomas induce a la piroptosis que es un mecanismo de muerte celular programada que consiste en la formación de poros en la membrana plasmática de la célula que provoca su lisis por el aumento de la presión osmótica. La ruptura de la célula conlleva la liberación de citoquinas proinflamatorias y DAMPs (408). En función de la caspasa que se activa, los inflammasomas pueden dividirse en subtipos canónicos (NLRP3, NLRP1, NLRC4, AIM2 y PYRIN) y subtipos no canónicos. Los inflammasomas canónicos requieren de estructuras multicomplejas y se activan por la caspasa-1, mientras que la vía no canónica se activa mediante la caspasa-4 o la caspasa-5 (399,409).

Los inflammasomas también están relacionadas con la activación y liberación de citoquinas como la IL1 β y la IL18 (410). Ambas citoquinas juegan un papel importante en la promoción de la inflamación y en coordinar la respuesta inmunológica innata y adaptativa (411).

Las principales células del sistema inmune innato son los macrófagos y las células dendríticas, aunque también juegan un papel importante las células epiteliales, las células endoteliales, y los fibroblastos. Las células dendríticas tienen capacidad fagocítica y se encargan de presentar el antígeno a los linfocitos CD4. Asimismo, los macrófagos son las principales células del sistema inmune innato y juegan un papel importante en la inflamación y en la homeostasis del hueso ya que presentan un gran número de PRRs (412). Los macrófagos pueden polarizarse a un fenotipo proinflamatorio (macrófagos M1), o a un fenotipo antiinflamatorio (macrófagos M2) en función de distintos factores locales (413–415).

Por otro lado, la inmunidad adaptativa regula la inflamación crónica mediante los linfocitos CD4⁺ (401). En la periodontitis, las células Th1 y Th17 inducen la progresión de la enfermedad ya que potencian la inflamación y activan la proteólisis y la

osteoclastogénesis; en cambio, las células Th2 y las Tregs (reguladores de los linfocitos T) contrarrestan estos procesos (401). El IFN- γ es la citoquina característica de las células Th1 que se encarga de activar las células fagocitarias mediante la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF α y la IL1 β . El IFN- γ también está relacionado con la osteoclastogénesis (401). Por su parte, las células Th17 exacerbaban la reacción inflamatoria al activar las células adyacentes para que produzcan mediadores inflamatorios (IL17), generando así un bucle positivo para la amplificación de la reacción inflamatoria (401). Los linfocitos B también pueden contribuir a la pérdida de hueso ya que son capaces de producir RANKL en respuesta a periodontopatógenos (416). Sin embargo, no son imprescindibles para que ocurra la reabsorción, de hecho, se ha comprobado que los linfocitos T pueden producir pérdida de hueso en ausencia de los linfocitos B (417).

Hasta el momento se han descrito las distintas respuestas del hospedador que actúan destruyendo los tejidos. No obstante, se debe tener en cuenta que como en casi todos los fenómenos celulares del cuerpo, existe un mecanismo de regulación que tiene como objetivo minimizar los daños. Esta regulación está mediada por citoquinas antiinflamatorias (p.ej., la IL10, el TGF β , el CD206, etc.) que pueden controlar o atenuar la progresión de la enfermedad.

Para asumir el objetivo específico₃ hicimos un ensayo celular con macrófagos de la línea celular THP-1. Mediante este experimento se estudió la citotoxicidad de las partículas de Ti6Al4V generadas por implantoplastia y las partículas de Ti c.p. no obtenidas por implantoplastia. También se comparó la expresión génica y la liberación de citoquinas asociadas con la inflamación celular inducida por ambas muestras.

A diferencia de los macrófagos primarios extraídos de muestras de sangre (PBMCS), la línea celular THP-1 no es tan sensible. Sin embargo, la homogeneidad genética de THP-1 facilita la reproducibilidad de los hallazgos encontrados. Además, esta línea celular se ha utilizado en numerosos estudios para evaluar la respuesta inmune inflamatoria por lo que permite comparar los hallazgos encontrados (418–420).

El primer paso en un ensayo celular es estudiar la citotoxicidad de las muestras para determinar la dilución a utilizar. En el estudio 3 las partículas de Ti6Al4V fueron más citotóxicas que las de Ti c.p. en el cultivo celular con THP-1. Este hecho podría deberse a la presencia de iones Al y V que, como ya se ha visto, son elementos citotóxicos que pueden provocar una disminución de la viabilidad celular en comparación con el Ti c.p. (370,421,422). También podría ser debido a las características fisicoquímicas de las partículas de Ti6Al4V que a diferencia del Ti c.p. se obtuvieron mediante implantoplastia.

En el campo de la biología celular existe cierta controversia acerca del uso de los antibióticos en los cultivos celulares (423). Se ha visto que los antibióticos pueden afectar distintos aspectos de las células como su metabolismo o su diferenciación (424,425). En esta línea, Ryu y cols. (423) destacaron que la combinación de penicilina-estreptomicina puede alterar la expresión génica en las células humanas, lo que puede tener un impacto evidente en este tipo de pruebas. En contraposición, el uso de antibióticos está recomendado por los principales protocolos de cultivo celular para mantener unas condiciones asépticas y reducir el riesgo de contaminación de la muestra (425). Este hecho es especialmente importante cuando se trabaja con la línea celular de macrófagos THP-1 ya que estas células son sensibles a las bacterias y a sus productos metabólicos. En este sentido, en el estudio 4 se decidió usar la combinación de penicilina-estreptomicina al 1 % para reducir la contaminación

bacteriana que podría tener un impacto en la polarización de los macrófagos.

Se evaluó tanto la expresión génica como la liberación de citoquinas ya que, aunque se exprese el gen en la célula, en ocasiones el RNA no llega a traducirse en proteínas. En esta línea, tanto el estudio 3 como diversos trabajos, han encontrado diferencias en la expresión génica y la liberación de citoquinas (336,418,426).

Las partículas de Ti6Al4V generadas por implantoplastia aumentaron la expresión génica de TNF α , aunque no fue capaz de inducir la liberación de su citoquina. La expresión de este gen fue significativamente más alta en los extractos con las partículas de Ti6Al4V generadas por implantoplastia que con las partículas de Ti c.p. El TNF α es una citoquina que actúa en la migración de células a la zona con inflamación o infección, y está relacionado con la expresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) y RANKL. El TNF α juega un papel importante en el desarrollo de la reacción inflamatoria y en la reabsorción ósea. En el caso de la periodontitis, este marcador también se ha relacionado con la pérdida de la inserción del tejido conectivo. Además, aumenta la producción de otras citoquinas proinflamatorias como la IL1 β y la IL6 (401). El TNF α se expresa en la membrana de los tejidos que rodean las prótesis articulares que presentan fenómenos de osteólisis asépticas provocada por partículas de metal. De hecho, se ha sugerido que esta citoquina tiene un papel crucial en la pérdida de hueso alrededor de las prótesis articulares mediante la activación de la vía NF- κ B (427).

Los extractos con Ti6Al4V incrementaron la expresión y liberación de IL1 β aunque sin cambios estadísticamente significativos, mientras que a las 48h los extractos con el Ti c.p. aumentaron la expresión y liberación de este marcador. La IL1 β desarrolla funciones inflamatorias, metabólicas, hematopoyéticas e inmunológicas. Además, también se encarga de regular el sistema inmune innato (411,428). Cuando los TLRs

de los macrófagos se activan al reconocer los PAMPs, se inicia la síntesis de la IL1 β . A partir de un segundo estímulo que involucra la activación de la vía del inflamasoma, el IL1 β finalmente es liberado. Este segundo estímulo se puede inducir por la interacción directa entre las bacterias o alguno de sus componentes con los inflamasomas, o bien, por la interacción con nanopartículas o formas solubles de un metal como el Cr, el Co o el Ti (391,429,430). El IL1 β promueve la inflamación mediante la migración de los leucocitos del torrente sanguíneo, además también induce la expresión de genes proinflamatorios que codifican la IL6 y la síntesis de óxido nítrico (411,428). Las partículas de Ti pueden funcionar como un estímulo secundario en el proceso inflamatorio de la periimplantitis. Se ha demostrado que cuando los macrófagos se exponen a partículas de Ti se libera una mayor cantidad de IL1 β a través de la vía del inflamasoma. Además, la liberación de esta citoquina fue superior cuando las células se expusieron a componentes bacterianos como el LPS (391).

Respecto a la expresión de CCR7, tanto los extractos de Ti6Al4V y de Ti c.p. indujeron una reducción de este marcador de superficie característico de los macrófagos M1. El CCR7 controla la maduración y la migración de las células dendríticas y los macrófagos (431,432). Las citoquinas quimiotácticas son péptidos que generalmente se liberan al medio extracelular. A partir de la unión con su receptor específico, se induce la activación de diversas señales intracelulares. El receptor específico de las quimioquinas pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (433).

Recientemente se ha publicado un estudio clínico transversal en el que se ha evaluado el líquido crevicular periimplantario para detectar trazas de Ti y establecer asociaciones entre los hallazgos clínicos del implante dental, los mediadores inflamatorios y los niveles de Ti (434). Se incluyeron 77 pacientes con 117 implantes

dentales y se encontró que el Ti estaba presente en el 82 % de las muestras. Además, se demostró una correlación entre la concentración de Ti y la expresión de marcadores proinflamatorios como IL-1 β e INF- γ (434). Por lo que se deduce que en el entorno clínico la presencia de Ti también puede estimular la liberación de marcadores proinflamatorios.

También se evaluó la expresión de los marcadores relacionados con los macrófagos M2. La IL10 puede inhibir la transcripción del mRNA de los mediadores inflamatorios después de la activación de los TLR (435). Además, esta citoquina también puede reducir la liberación de las citoquinas proinflamatorias (p.ej., el IFN- γ o la IL17) por parte de las células Th1 (436). En el estudio 3 los extractos Ti6Al4V fueron capaces de inducir una disminución significativa en la liberación de IL10.

Por otro lado, los extractos de Ti6Al4V indujeron una reducción significativa en la expresión génica de TFG β . La familia del TFG β es un grupo de citoquinas involucradas en la diferenciación celular, la regulación de la respuesta del sistema inmune, en la angiogénesis y en la formación de matriz extracelular (437).

Concretamente, el TFG β es un potente inmunosupresor que impide la transcripción de las citoquinas proinflamatorias IL1 β , el TNF α y las metaloproteinasas de la matriz extracelular. Además, se le atribuye una función protectora contra la destrucción de los tejidos ya que se ha comprobado que a mayor concentración de TFG β , disminuye la concentración de RANKL (401,414).

El otro marcador que se estudió fue el CD206 que es un receptor de manosa que se expresa en los macrófagos M2. La expresión génica del marcador CD206 disminuyó significativamente con los extractos de Ti6Al4V y de Ti c.p. Este receptor transmembrana también se puede expresar por las células dendríticas o células

endoteliales. La función del CD206 está relacionada con el control de la endocitosis, la fagocitosis y en la eliminación de glicoproteínas no deseadas (438,439).

En resumen, los resultados del cultivo en los macrófagos THP-1 estimulados con los extractos de Ti6Al4V muestran que la expresión de TNF α aumentó significativamente, mientras que no se observaron diferencias en la IL1 β respecto al control negativo de la inflamación. Al analizar la expresión de los genes anti-inflamatorios, los extractos Ti6Al4V provocaron un aumento en la expresión de IL10, así como una reducción significativa en la expresión de TGF β y CD206. La disminución en la expresión de estos dos últimos genes, así como el aumento en la expresión de TNF α estarían indicando que los extractos Ti6Al4V son capaces de inducir una respuesta pro-inflamatoria. Además, comparando los resultados de los extractos Ti6Al4V respecto a los extractos Ti c.p., se puede observar que hay un aumento en la expresión de TNF α y de IL10, así como una reducción en la expresión de los marcadores CCR7 y CD206 a las 48h. Por lo tanto, la aleación podría inducir una reacción inflamatoria más acusada en comparación con el Ti c.p.

Diversos estudios in vitro han reportado que las partículas de Ti pueden inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias y, por lo tanto, provocar la polarización de los macrófagos a un fenotipo M1 (440). Por ejemplo, los macrófagos en contacto con las partículas metálicas provenientes de las prótesis articulares expresan mayores niveles de mRNA para los TLR (especialmente TLR4) y sus adaptadores intracelulares (MyD88, TRIF, NF- κ B) y también liberan más citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL1 β , IL6) (427,440,441). Parece que la interacción entre las partículas metálicas generadas por el desgaste articular y los TLRs inducen la cascada inflamatoria y la osteólisis alrededor de las prótesis articulares (440,442–444). Sin embargo, diversos trabajos han sugerido que la vía de señalización intracelular del inflamasoma también podría estar relacionada con la osteólisis aséptica que ocurre alrededor de las prótesis de

articulares (445–448). La activación de la vía del inflamasoma es a través del reconocimiento de los DAMPs o de las partículas metálicas que han entrado en la célula por endocitosis (370,448,449).

En el campo de la implantología bucal se ha comprobado que en lesiones extensas de periimplantitis existe una mayor proporción de macrófagos M1 (450). Eger y cols. (451) demostraron que las partículas de metal desprendidas durante el raspado de un implante dental fueron fagocitadas por los macrófagos y provocaron una respuesta proinflamatoria con la liberación de marcadores asociados a la osteoclastogénesis como el $\text{TNF}\alpha$, la $\text{IL1}\beta$ y la IL6 . Por otro lado, un estudio en modelo animal evaluó la pérdida ósea marginal alrededor del implante y la polarización de los macrófagos después de introducir 20 μg de Ti en los tejidos periimplantarios. Los autores de este trabajo reportaron que las partículas de Ti produjeron una pérdida ósea marginal en ausencia de bacterias e indujeron la liberación de los marcadores $\text{TNF}\alpha$, la $\text{IL1}\beta$ y la IL6 por parte de los macrófagos M1 (432). Estos resultados coinciden con los hallazgos del estudio 3 y refuerzan la idea de que las partículas de Ti podrían tener un papel en el desarrollo o el empeoramiento de las enfermedades periimplantarias.

El componente celular del hueso está formado por el linaje osteoblástico (osteoblasto, osteocito y célula de recubrimiento óseo) y por los osteoclastos. Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas que se forman a partir de la fusión y maduración de células mononucleares del linaje monocito/macrófago. En el hueso solo hay dos o tres osteoclastos por μm^3 y se localizan en el periostio y dentro de los sistemas de Havers. Presentan dos estados funcionales diferenciados; la fase móvil y la fase de reabsorción. Durante el estado móvil migran desde la médula ósea hasta su lugar de reabsorción, su núcleo no está polarizado y presenta una morfología aplanada. En

cambio, en la fase de reabsorción los osteoclastos ejercen su función de degradación de la matriz ósea mediante la liberación de ácido clorhídrico y la proteólisis. Durante la fase de reabsorción la morfología de estas células es cuboidal y tienen el núcleo polarizado (78).

Las células pluripotenciales mesenquimales se diferencian en el linaje osteoblástico (osteoblastos, osteocitos y células de recubrimiento óseo) gracias a Runx2. Los osteocitos son células embebidas en una matriz ósea mineralizada. Representan el 95 % del componente celular del hueso y se encuentran interconectados entre sí y con el resto de las células óseas a través de filopodios. Los osteocitos se localizan en las lagunas de la matriz ósea neoformada en un estado de quiescencia. Estas células son mecanorreceptores capaces de transducir un estímulo mecánico en un proceso biológico de remodelación ósea. Los osteocitos son la principal fuente de RANKL que es una proteína necesaria para la diferenciación y la función osteoclástica. Además, el RANKL también regula la proliferación, diferenciación y supervivencia celular de los osteoblastos a través de las vías de señalización Wnt. Por otro lado, las células de recubrimiento óseo provienen de los osteoblastos y se encuentran sobre la superficie ósea. Aunque estas células corresponden a una forma relativamente inactiva de osteoblastos, juegan un papel relevante en la neoformación ósea y en la activación de marcadores inductores de la osteoclastogénesis. Por último, los osteoblastos son células mononucleares de entre 20-30 μm de diámetro. Estas células pasan por una etapa proliferativa, caracterizada por la producción de proteínas como las histonas, la fibronectina y el colágeno tipo I. Posteriormente, comienzan a producir y madurar una matriz extracelular osteogénica y expresan genes como la fosfatasa alcalina, la BSP y el colágeno tipo I. Por último, los osteoblastos expresan genes implicados en la mineralización de la matriz extracelular, como la osteocalcina (OC), la osteopontina y la colagenasa. La regulación de este complejo sistema de expresión genética y

diferenciación celular corre a cargo de la expresión de diversos factores de transcripción como Runx2, BMPs, Osterix, etc. (452–455).

Igual que ocurrió con el cultivo de macrófagos, la citotoxicidad de los extractos de Ti6Al4V fue más elevada en el medio osteogénico. Las partículas de Ti pueden afectar la viabilidad celular de las BM-MSCs induciendo su apoptosis mediante la activación de las proteínas supresoras de tumores p53 y p73. Este hecho depende de la composición del material, la cantidad de partículas y el tiempo de exposición (456). Autores como Meng y cols. (457) han reportado que las partículas de Ti tienen un efecto citotóxico sobre las BM-MSCs y que podrían inhibir la formación de hueso alrededor del implante. En esta línea, nuestros ensayos celulares en medio osteoblástico mostraron que las partículas de Ti6Al4V redujeron la expresión de los marcadores Runx2 y OC que son un indicador temprano y tardío respectivamente de la diferenciación osteogénica (458,459).

Respecto al objetivo específico₃, parece que las partículas de Ti podrían ser capaces de inhibir la osteoblastogénesis e inducir una reacción proinflamatoria con la liberación de citoquinas que están relacionadas con la osteoclastogénesis. Por lo tanto, se acepta la hipótesis específica₃. Estos hallazgos son similares a los reportados en las osteólisis asépticas en las prótesis totales articulares, por lo que se refuerza la idea de que las partículas de Ti c.p. y de Ti6Al4V podrían estar relacionadas con el desarrollo o el agravamiento de las enfermedades periimplantarias. Sin embargo, se requieren estudios in vivo para comprender mejor el efecto de los residuos metálicos en el entorno periimplantario.

- **Objetivo específico₄: Evaluar la reacción tisular perilesional inducida por la acumulación de partículas de Ti en aleación en un defecto mandibular en rata**

Aunque tradicionalmente los implantes de Ti han sido considerados biológicamente bioinertes (30), un creciente número de trabajos apuntan a que las partículas de Ti podrían causar o acelerar el remodelado óseo periimplantario a través de la inducción de una reacción inflamatoria y la activación de la osteoclastogénesis (305,308,460,461). En apartados anteriores ya se ha descrito que existen distintos mecanismos de liberación de partículas de Ti, como por ejemplo: la fricción del implante dental con el hueso durante su colocación, el desgaste mecánico provocado por la descontaminación de la superficie implantológica, el desgaste provocado por el aditamento y el implante, la corrosión causada por agentes químicos o por las sustancias liberadas por bacterias o células inflamatorias (332,460,461). Entre los diferentes mecanismos de liberación de partículas de Ti o de Ti en aleación al entorno periimplantario, la implantoplastia es sin duda la técnica que libera una mayor cantidad de residuos metálicos al entorno periimplantario (462).

Se debe recordar que ningún biomaterial metálico por muy biocompatible que sea, es completamente inerte a lo largo del tiempo. Esto se ha comprobado con los implantes dentales, pero también con las prótesis ortopédicas (427).

La cadera es una articulación que está compuesta por la cabeza femoral y por la cavidad de la pelvis denominada acetábulo. En la artroplastia total de cadera se sustituyen estos elementos por una copa acetabular y una cabeza femoral que se incrusta al fémur mediante su tallo. Las prótesis de cadera están fabricadas básicamente de Cr-Co, o bien, de aleaciones de Ti. En un inicio, se utilizaron prótesis de metal sobre metal pero al observar que había una alta tasa de fracaso se reemplazaron por una copa acetabular de polietileno de alto peso molecular (463,464). Sin embargo, la degradación del polietileno en forma de partículas también se ha visto

relacionada con fenómenos de osteólisis (465,466). Finalmente se introdujeron las prótesis de metal sobre metal de nueva generación que presentan una cabeza femoral más grande y una copa acetabular más delgada. Con esta modificación del diseño se consigue que el desgaste de este tipo de prótesis sea menor (465). En la Figura 57 se puede ver una radiografía de un paciente con una artroplastia total de cadera y de rodilla.

Aproximadamente se realizan 1.5 millones de artroplastias al año en todo el mundo (467). Aunque el porcentaje de supervivencia de estas prótesis es alto, el 75 % de los fracasos de estas prótesis a largo plazo está provocado por una reabsorción ósea local (444). Este fenómeno de osteólisis está producido por partículas metálicas liberadas durante la fricción de las dos superficies articulares (468). La aparición de esta complicación suele producirse 5 años después de la implantación ortopédica (427,469,470). Dicha osteólisis está producida por la liberación de partículas metálicas (p. ej., Ti, Fe, Cr, Mo), cerámicas o de polietileno. Se ha descrito que las prótesis metal sobre metal de Cr-Co liberan hasta 2.5×10^{14} partículas metálicas por año. El tamaño y la morfología de estas partículas varía en función del diseño y del material de la prótesis. Parece que las prótesis metal sobre metal son las que liberan las partículas más pequeñas que oscilan entre los 20 nm y los 90 nm (471). En el caso de las prótesis de metal sobre polietileno de alto peso molecular, el tamaño de partícula oscila en los 660 nm de media. No obstante, el análisis de los tejidos de alrededor de las prótesis totales fracasadas pone de relieve que las partículas más grandes pueden tener algún milímetro de tamaño (427). Como se verá más adelante, el tamaño de partícula es un parámetro relevante ya que condicionará la respuesta inmune del hospedador (472).

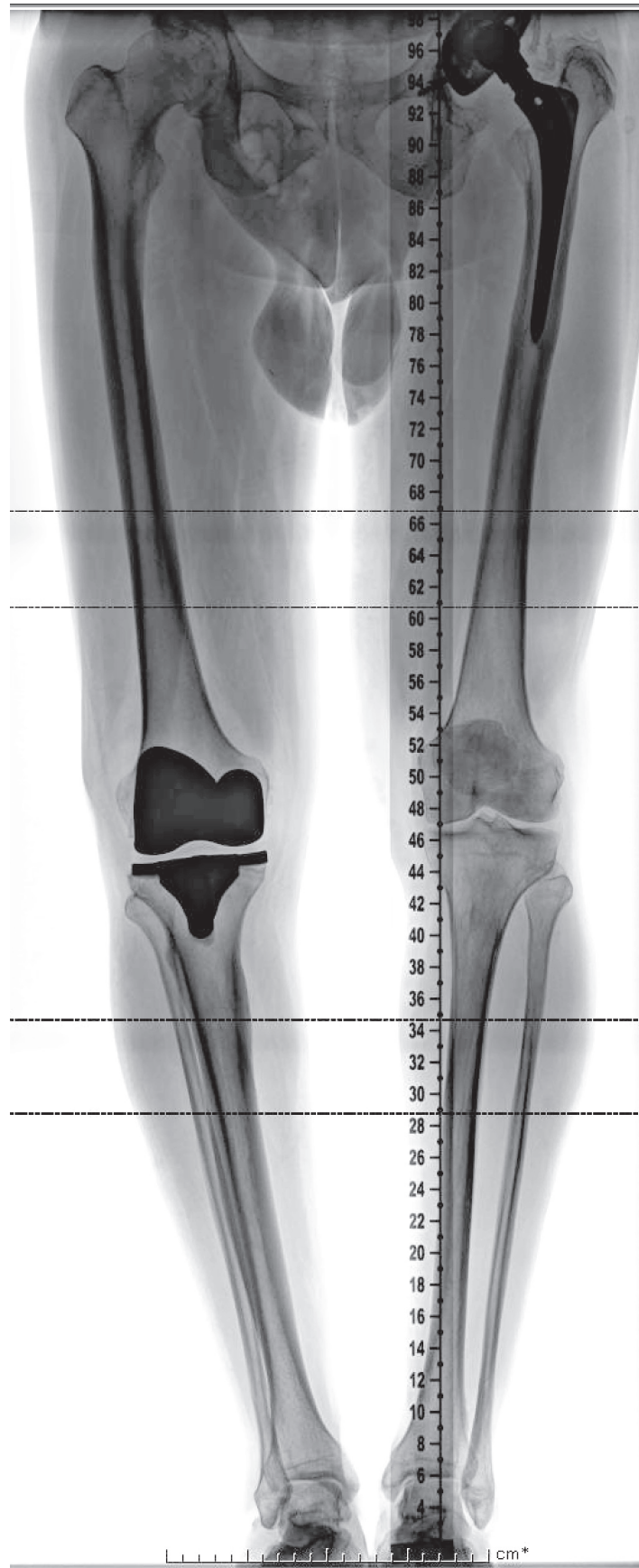


Figura 57. Imagen radiográfica de un paciente con una prótesis total de cadera y de rodilla. Imagen cedida por el Dr. Sales.

Las partículas metálicas generadas por el desgaste articular pueden provocar una enfermedad denominada metalosis que se caracteriza por un ennegrecimiento y necrosis de los tejidos circundantes, osteólisis aséptica y una masiva liberación de iones al organismo que puede llegar a ser tóxica (Figura 58). La metalosis es una entidad relativamente infrecuente que clínicamente se caracteriza porque el paciente presenta dolor, inflamación, sensación de inestabilidad, dislocaciones, luxaciones y erupciones cutáneas que son indicativas de necrosis (473).

Aunque las metalosis se han descrito sobre todo en zonas de gran desgaste como las prótesis de cadera o de rodilla, también se han reportado casos de metalosis en artroplastias totales de hombro, muñeca y codo (474). El diagnóstico de esta entidad provoca la necesidad de retirar los implantes articulares, limpiar los tejidos, así como de reconstruirlos (305). Además, como consecuencia de esta enfermedad también pueden aparecer pseudotumores, y patología cardíaca y neurológica (475). Entre las partículas que pueden producir esta pérdida aséptica de la prótesis se encuentra el Ti que, dependiendo del tamaño, forma, concentración, así como de las propiedades fisicoquímicas de sus partículas, genera una respuesta local que causa el aflojamiento de la prótesis. Estas partículas de desgaste de la prótesis articular pueden inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias y consecuentemente activar la osteoclastogénesis. En la Figura 59 se puede ver una imagen clínica de un paciente con metalosis que se sometió a un procedimiento quirúrgico para retirar la prótesis de cadera. También se aprecia el ennegrecimiento de los tejidos circundantes a la prótesis.

En resumen, se ha comprobado que en el campo de la Cirugía Ortopédica existe un proceso de osteólisis alrededor de las prótesis articulares no dependiente de bacterias (Figura 60). Este hecho ha provocado que algunos investigadores propongan que las

enfermedades periimplantarias no tienen por qué deberse exclusivamente a la acumulación de placa bacteriana, si no que pueden ser debidas a una reacción a cuerpo extraño, o a la activación de otras vías de inflamación que provocan la pérdida ósea alrededor del implante. En cualquier caso, parece lógico pensar que, si hay una gran liberación de partículas metálicas al entorno periimplantario, como con la implantoplastia, éstas puedan provocar una reacción inflamatoria y una osteólisis alrededor del implante que incluso podría estar agravada por la presencia de bacterias (445). Los estudios 3 y 4 representa una primera aproximación para estudiar la respuesta inflamatoria y osteogénica inducida por las partículas metálicas de Ti en aleación liberadas durante el fresado de la implantoplastia.

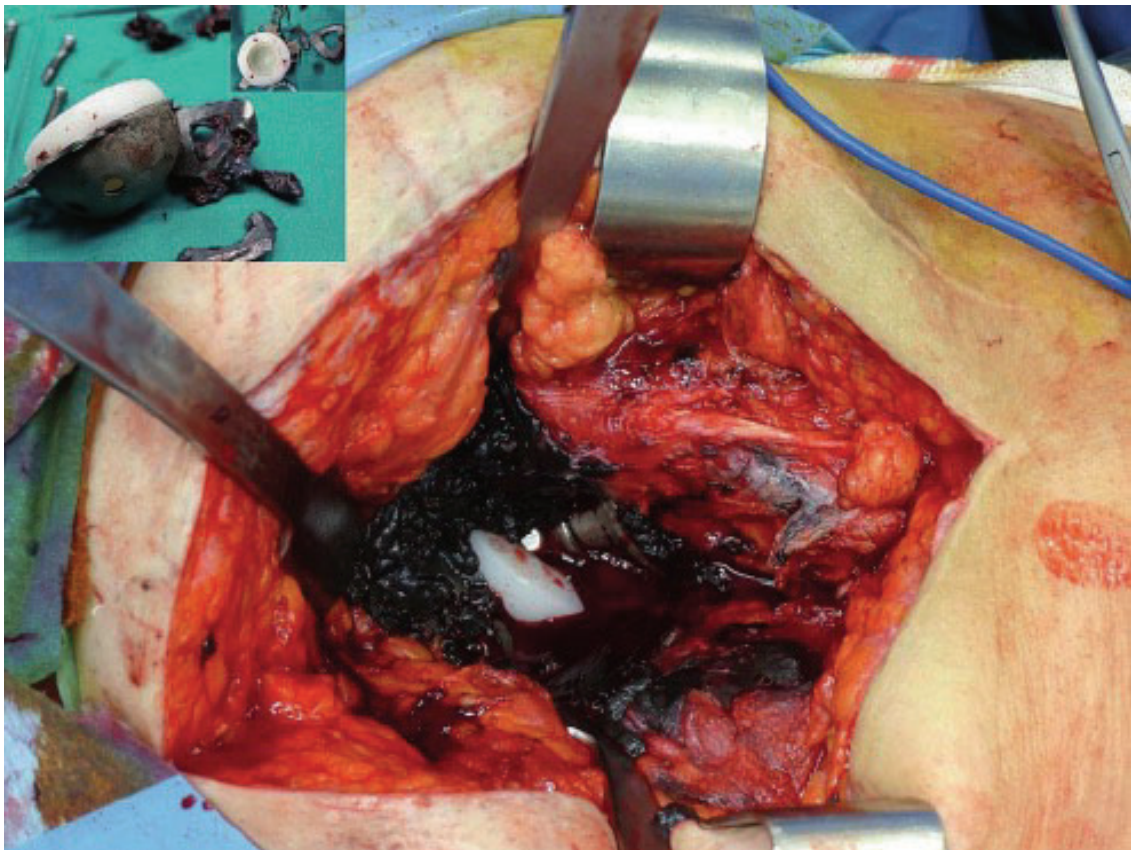


Figura 58. Imagen de una intervención quirúrgica para la retirada de una prótesis articular de cadera por metalosis. Se puede observar la tinción oscura de los tejidos que rodean la prótesis. Imagen cedida por el Dr. Babis.

El efecto biológico local y sistémico de los productos de degradación del Ti o del Ti en aleación (p.ej., nanopartículas e iones) liberados por fenómenos de tribocorrosión no es del todo conocido; sin embargo, se han descrito reacciones de hipersensibilidad, toxicidad, osteólisis e incluso mutagenicidad y carcinogénesis (476–479).

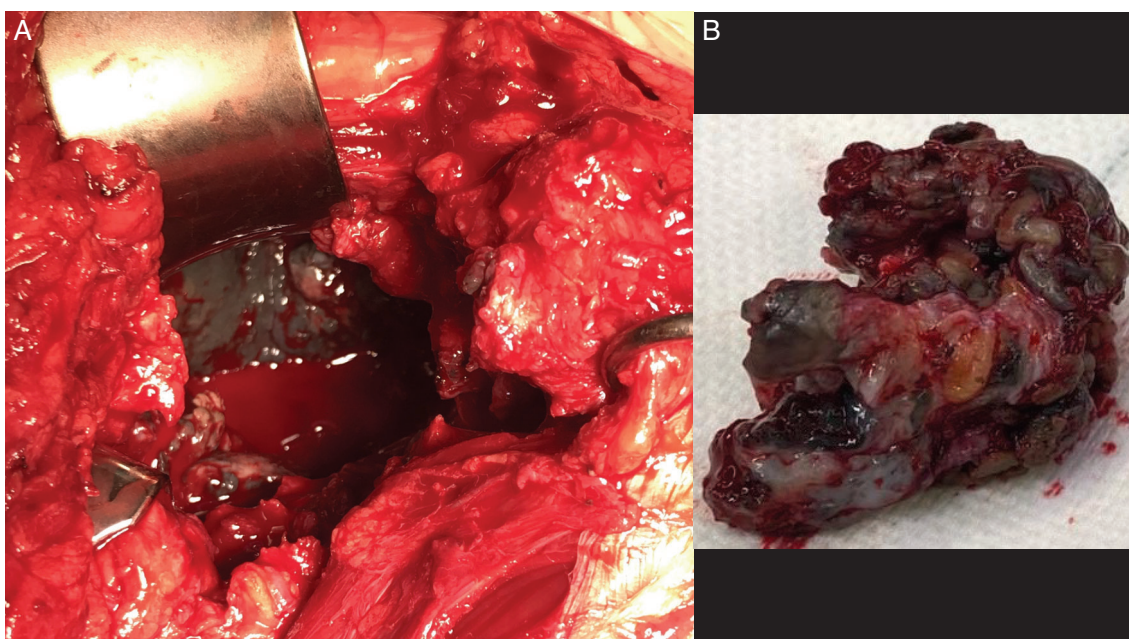


Figura 59. Imagen de una intervención en la que se retiró una prótesis total de cadera por metalosis. Se puede observar la tinción oscura de los tejidos circundantes a la prótesis (A) y la muestra retirada (B). Imagen cedida por el Dr. Sales.

Respecto a la respuesta local que pueden producir las partículas de Ti en los tejidos periimplantarios, el estudio 4 demostró mediante un análisis histológico con tinción de hematoxilina-eosina que los residuos metálicos de la implantoplastia provocan una inflamación crónica con una reacción granulomatosa a cuerpo extraño caracterizada por la presencia de histiocitos y células gigantes multinucleados. En todas las ratas del grupo experimental se identificaron partículas metálicas con contornos irregulares y birrefringentes bajo luz polarizada. Schwarz y cols. (480) observaron resultados similares en un estudio experimental en seis perros. Concretamente, los autores describieron que alrededor de las partículas metálicas de la implantoplastia había áreas altamente vascularizadas y delimitadas por un infiltrado inflamatorio crónico

290

mixto. En un reciente estudio de casos y controles se analizó la presencia de partículas de Ti en biopsias de lesiones periimplantarias (481). Se recogieron 39 casos de periimplantitis y 35 controles con periodontitis. Los resultados mostraron que en todos los casos de periimplantitis se detectaron partículas de Ti en el tejido de granulación. Curiosamente, no se encontraron restos de Ti en el interior de los macrófagos o las células gigantes multinucleadas en ninguna biopsia de periimplantitis. De este modo, los autores concluyeron que las partículas de Ti no provocan una reacción de cuerpo extraño ni ningún efecto patológico sobre los tejidos periimplantarios (481). Estos resultados deben tomarse con precaución ya que únicamente se analizó el tejido de granulación, pero no el tejido conectivo subepitelial que es el responsable de desarrollar la reacción inflamatoria.

Por otra parte, también se ha evaluado el tejido de alrededor de las prótesis articulares fracasadas y se ha reportado que las partículas metálicas de desgaste provocan una reacción granulomatosa a cuerpo extraño con la presencia de partículas negras y birrefringentes (482,483). Estas características histológicas concuerdan con los hallazgos del estudio 4. Por lo tanto, pudimos aceptar la hipótesis específica⁴, es decir, las partículas metálicas de Ti6Al4V insertadas en un defecto mandibular en rata provocan una reacción inflamatoria a cuerpo extraño.

Es importante recordar que el epitelio constituye la primera defensa contra los cuerpos extraños en la cavidad bucal. La función del epitelio es actuar como una barrera y activar el sistema inmune a través de los TLRs y NLRs. En un interesante estudio publicado por Suárez-López del Amo y cols. (307) se analizó el efecto que producían las partículas de Ti generadas por implantoplastia en las células epiteliales. Los autores encontraron que los residuos metálicos activaron los marcadores BRCA1 y CHK2. Ambas proteínas están relacionadas con el desarrollo y la progresión de tumores (484) y cuando se expresan implican daño en el DNA de la célula. Aunque el

gen BRCA1 demostró ser más sensible para detectar daño genómico producido por las partículas de Ti, ambas proteínas se expresaron en las células epiteliales NOK-SI. Los hallazgos de Suárez-López del Amo y cols. (307) son especialmente relevantes si consideramos que se ha visto que las partículas de Ti pueden internalizarse dentro de las células epiteliales y los macrófagos.

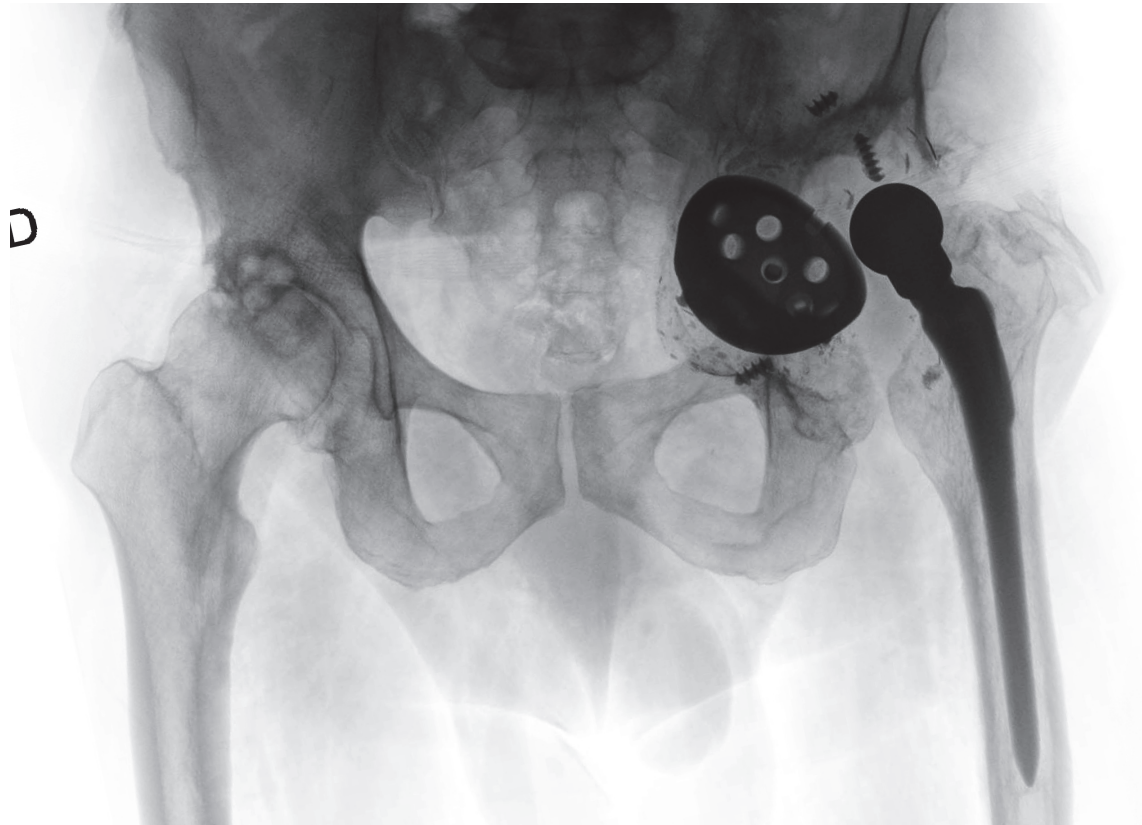


Figura 60. Aflojamiento de la copa acetabular en una prótesis total de cadera. Imágen cedida por el Dr. Sales.

Los residuos metálicos se detectan por el sistema inmune del hospedador como cuerpos extraños y provocan distintas reacciones en función de su tamaño (485). La principal célula encargada de mediar esta reacción a cuerpo extraño son los macrófagos. De este modo, se ha reportado que las partículas de mayor tamaño se suelen encapsular con tejido fibrótico como un mecanismo de defensa para aislar las partículas del medio fisiológico y de esa manera reducir su interacción (157). Las

partículas de un tamaño $< 10 \mu\text{m}$ pueden ser fagocitadas por los macrófagos e inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias y activar la osteoclastogénesis (486). Por otro lado, las nanopartículas (1 - 100 nm) pueden pasar inadvertidas para los macrófagos pero se han asociado con reacciones inflamatorias, disfunción mitocondrial, estrés y daño en el DNA (487,488). Así, teniendo en cuenta el rango de tamaño de las partículas de Ti liberadas durante la implantoplastia se podría esperar las distintas respuestas inmunitarias del hospedador.

Es evidente que las bacterias juegan un papel importante en el desarrollo de las enfermedades periimplantarias. Existen muchos trabajos que han demostrado una relación causa-efecto entre la presencia de un biofilm disbiótico y la aparición de inflamación y pérdida ósea marginal alrededor del implante dental (136). No obstante, la gran controversia actual en la etiología y la patogénesis de las enfermedades periimplantarias es si realmente las partículas de Ti provocan inflamación y osteólisis, tal y como se ha comprobado en las prótesis totales de cadera o rodilla (489). Parece que la opinión más generalizada es que no existen datos para correlacionar el inicio o el desarrollo de las enfermedades periimplantarias con los residuos metálicos ya sea en su forma soluble en iones o en su forma nanoparticulada (136). Sin embargo, la concentración de Ti es superior en los implantes dentales que tienen periimplantitis en comparación con los implantes dentales sanos (392,490). Además, cada vez surgen más datos que relacionan la presencia de partículas de Ti con la aparición de inflamación y osteólisis (160,163,491–493). Teniendo en cuenta estos trabajos y las investigaciones que componen la presente tesis doctoral creemos que existe una plausibilidad biológica que explica entre otras cosas, porqué la periimplantitis tiene un comportamiento distinto a la periodontitis. Estas dos entidades pueden parecer clínicamente similares; sin embargo, su comportamiento clínico y su respuesta al tratamiento es muy distinto. En esta línea, Becker y cols. (494) compararon las características moleculares de la periimplantitis y la periodontitis, y observaron que

habían pocas similitudes entre ambas. Estos datos no hacen más que reforzar la idea de que hay diferentes procesos biológicos que subyacen a las dos entidades.

Debe tenerse en cuenta que además de los mecanismos etiopatogénicos comentados, los iones de Ti también pueden inducir una modificación en la composición del co-agregado de bacterias que crece sobre la superficie del implante hacia un biofilm disbiótico (495,496). Por lo tanto, ya sea por el efecto proinflamatorio propio del Ti o mediante la modificación del biofilm oral, las partículas y los iones de Ti pueden incrementar el riesgo de sufrir periimplantitis o de desarrollar lesiones periimplantarias más graves.

En resumen, existe un gran número de publicaciones que concluyen que los iones/partículas de Ti podrían contribuir en la aparición o el agravamiento de la periimplantitis a través de distintos mecanismos, como la inducción de una reacción inflamatoria a cuerpo extraño, de un daño genómico, de una respuesta proinflamatoria aumentada o de una disbiosis del biofilm periimplantario (358).

- **Objetivo específico₅: Determinar la translocación de iones y nanopartículas de Ti sangre, bazo, pulmones, hígado, cerebro y riñones después de insertar los residuos metálicos de la implantoplastia en un defecto mandibular en rata.**

Los iones y las nanopartículas son dos formas diferentes de Ti que coexisten en el entorno periimplantario (462,497). De hecho, la mucosa de alrededor de los implantes dentales con periimplantitis presenta una mayor concentración de Ti en comparación con la mucosa de los implantes sanos (392,490). Olmedo y cols. (490) demostraron mediante citología exfoliativa que en los implantes con periimplantitis había una

concentración de 2.44 ppb de Ti mientras que en los implantes sanos la concentración de Ti fue de 0.88 ppb ($p < 0.05$). Además, los estudios que han analizado la presencia de Ti alrededor del implante dental han reportado un tamaño de partícula que oscila entre los 0.1 μm y los 12 μm (462).

Actualmente existen numerosos artículos primarios y trabajos de revisión que relacionan la presencia de Ti con una respuesta proinflamatoria y la activación de la osteoclastogénesis (305,307,332,462,493,498,499). Sin embargo, el último documento de consenso entre la EFP y la AAP destacó que aún no hay estudios clínicos prospectivos en humanos que demuestren que exista una relación causa-efecto entre las partículas de Ti y las enfermedades periimplantarias (100).

En los estudios 4 y 5 se evaluó las concentraciones de los iones y las nanopartículas metálicas, respectivamente, provenientes de los residuos metálicos de la implantoplastia. Se diseñó un modelo animal en rata en el que se practicó un defecto mandibular contenido que fue rellenado con estas partículas de Ti6Al4V. Después de 30 días de estudio se practicó la eutanasia humanizada de los animales de experimentación y se extrajeron el cerebro, el bazo, el hígado y los pulmones para su posterior análisis mediante ICP-MS. Los resultados demuestran que hubo una translocación de iones metálicos de la zona de la implantación hacia distintos órganos alejados. Sin embargo, se debe señalar que la concentración de estos iones metálicos en los diferentes tejidos fue baja (ng/g), y que aún se desconocen sus posibles efectos clínicos.

Las formas solubles del Ti se pueden generar gracias a la presencia de moléculas como citratos o tartratos en los líquidos/fluidos biológicos (500). Los iones de Ti que se han creado por los fenómenos de corrosión y que se encuentran alrededor de los implantes dentales pueden transportarse a otros tejidos principalmente a través del

torrente sanguíneo, donde estos iones se unen a la transferrina sérica (497). También se ha sugerido que las partículas de Ti pueden viajar por la sangre y depositarse en órganos con actividad macrofágica, como el hígado, el bazo y los pulmones (501).

Para comprobar la translocación de los iones metálicos a través del torrente sanguíneo se recogieron muestras de sangre antes de la cirugía y antes de la eutanasia. Los resultados del estudio 4 no permitieron detectar diferencias estadísticamente significativas en la concentración de iones metálicos en sangre ni entre grupos de estudio ni intra-sujeto (muestras de sangre previa a la cirugía *versus* posterior a la cirugía). En contraposición, en un reciente estudio de Domingo y cols. (502) en el que se evaluó el efecto sistémico de las micro- y las nanopartículas de TiO₂ en un modelo en rata Wistar, sí que encontraron presencia de Ti en la sangre. Las diferencias entre ambos trabajos seguramente se deban a la diferente vía de administración de las partículas de Ti. En el estudio 4 los residuos metálicos se introdujeron en un defecto mandibular mientras que en el trabajo de Domingo y cols. (502) las partículas se inyectaron en forma de suspensión por vía interperitoneal. Resulta importante señalar que en el ámbito clínico los pacientes con prótesis ortopédicas presentan altos niveles séricos de Ti, Cr, o Co, especialmente cuando existe un desgaste de las superficies articulares (503–506). De hecho, se ha sugerido monitorizar los niveles de metales en sangre para conocer el deterioro de estas prótesis (507–509).

Respecto a la translocación de iones a los distintos órganos diana, la concentración media de iones Al en todos los tejidos se situó en torno a los 1000 ng/g, lo que coincide con los niveles basales de Al en los tejidos de rata señalados en publicaciones anteriores (510). Por otro lado, la concentración media de V fue de aproximadamente 10 ng/g en el cerebro, el hígado y el pulmón, mientras que en el

bazo fue 5 veces superior. Estos hallazgos obtenidos en el estudio 4 coinciden con los valores reportados por diversos autores (511,512). Por último, encontramos que la concentración media de los iones Ti fue de aproximadamente 500 ng/g. La introducción de las partículas metálicas generadas por la implantoplastia provocó un incremento en la concentración de iones de Ti en el hígado, el cerebro y el bazo de los animales del grupo experimental en comparación con el grupo control. Además, la concentración de iones de V en el cerebro también fue superior en el grupo experimental ($p < 0.05$).

Diversos trabajos (513–516) también han identificado el Ti de un implante dental en otras regiones del organismo animal como, por ejemplo, en la sangre, los ganglios linfáticos, los pulmones, el hígado, el bazo y los riñones. En esta misma línea, Geraets y cols. (517) obtuvieron unos resultados similares a los reportados en el estudio 4 en términos de distribución del Ti en los tejidos. Los autores administraron por vía oral e intravenosa nanopartículas de TiO_2 a ratas de experimentación y observaron que las mayores concentraciones de Ti se localizaron en el bazo, en el hígado y en los pulmones. Por otro lado, también se han detectado altos niveles de Ti en diversos órganos (p.ej., bazo, hígado y riñón) de pacientes portadores de prótesis de cadera o rodilla (518). Todos estos estudios ponen de relieve que el Ti puede diseminarse por diversos lugares del organismo humano/animal.

No es sorprendente que el Ti sea el metal que muestra mayores diferencias entre el grupo experimental y el grupo control, ya que las partículas metálicas que se introdujeron en el defecto mandibular eran de una aleación de Ti que contenía un 6 % de Al y un 4 % de V. Por lo tanto, el Al y el V son componentes minoritarios y sus concentraciones fueron consecuentemente más bajas. Aun así, ya se ha comentado que en el estudio 4 observamos una mayor concentración de iones V en el cerebro de

la rata experimental. Este hecho está en concordancia con el estudio 1 donde las partículas de Ti6Al4V presentaban una mayor liberación de iones V.

Existe cierta controversia con el uso de dispositivos médicos hechos de aleaciones de Ti6Al4V debido a la presencia del Al y del V (27). Concretamente, el Al puede provocar deficiencias en la mineralización del hueso y desórdenes neuronales. De hecho, se ha asociado a la enfermedad del Alzheimer y a fragilidad ósea (519). Además, el Al podría ser capaz de inducir la expresión de marcadores relacionados con la inflamación y la apoptosis (370). Por otra parte, el V se ha relacionado con procesos de carcinogenicidad, inmunotoxicidad y neurotoxicidad (421). Costa y cols. (520) reportaron que la liberación de V produjo una reducción de la viabilidad celular de osteoblastos y fibroblastos, lo que podría explicar los hallazgos observados en los cultivos celulares del estudio 1. Por todo ello, algunos autores abogaron por evitar el V en las prótesis ortopédicas y utilizar otras aleaciones del Ti como el Ti6Al7Nb (422). Sin embargo, hasta la fecha, no existen datos clínicos que confirmen esta toxicidad del V por lo que las aleaciones de Ti6Al4V se siguen utilizando tanto en Implantología bucodental como en Ortopedia y Traumatología.

Recientemente, se ha analizado el efecto sistémico de las partículas de TiO₂ en un modelo en ratas Wistar (502). Los autores al cabo de 30 días de inocular una suspensión de micro- y nanopartículas de TiO₂ llevaron a cabo pruebas bioquímicas, un estudio histopatológico, así como un recuento de la concentración de iones en los órganos diana y un análisis del metabolismo oxidativo. Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que la determinación de los marcadores bioquímicos séricos y el análisis del metabolismo oxidativo no son bioindicadores tempranos del daño tisular causado por las partículas de TiO₂. Por otro lado, en la línea de los resultados

obtenidos en el estudio 4, la concentración de iones Ti fue significativamente superior en el hígado y en los pulmones de las ratas del grupo experimental.

Como ya se ha comentado anteriormente, las implicaciones clínicas de la translocación de algunos iones metálicos a órganos alejados del defecto mandibular siguen sin conocerse. Sin embargo, en la literatura se ha reportado que elevadas concentraciones de iones Cr y Co pueden inducir daño hepático, cardíaco, otológico y renal (509). A su vez, diversos estudios in vitro han demostrado que el Ti también puede provocar reacciones celulares adversas (128). Por ejemplo, Liao y cols. (521) observaron que la proliferación osteoblástica puede inhibirse si hay una concentración de 10 mg/L de iones de Ti. También se ha reportado que la presencia excesiva de iones de Ti podría impedir la mineralización de la matriz extracelular ósea, inducir la osteoclastogénesis y provocar la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) (432,472,522).

Además de los iones metálicos, también se han encontrado residuos metálicos nanoparticulados en el tejido periimplantario (462,493). Las nanopartículas (1-100 nm) tienen una mayor relación superficie/volumen por lo que son biológicamente más reactivas y potencialmente más tóxicas que las micropartículas (472). De hecho, su toxicidad es tamaño-dependiente por lo que las nanopartículas más pequeñas presentan una mayor toxicidad que las micropartículas (>100 nm) (523). De hecho, según la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) las nanopartículas de TiO₂ están clasificadas como “posiblemente carcinogénicas para los humanos”.

Respecto a la liberación de nanopartículas, la superficie del implante dental y las partículas metálicas de la implantoplastia pueden ser una fuente potencial de liberación de micropartículas y de nanopartículas en el medio biológico. Sin embargo,

existen muy pocos datos sobre los efectos biológicos y la biodistribución de las nanopartículas de Ti en el organismo.

Las micropartículas y las nanopartículas pueden ser químicamente similares; sin embargo, sus propiedades físico-químicas específicas pueden provocar respuestas biológicas diferentes (523). En este sentido, parece que existe una relación directa entre el tamaño de la partícula metálica y la aparición de alteraciones en los pulmones, hígado y riñones. A diferencia de las micropartículas, las nanopartículas de Ti fueron capaces de provocar focos de necrosis en el hígado de la rata y generar depósitos de TiO_2 en el interior de los glomérulos renales en el estudio de Bruno y cols. (524). En esta línea de investigación, también se ha reportado que los depósitos de nanopartículas de TiO_2 en los pulmones pueden provocar un engrosamiento de los tabiques alveolares y un infiltrado inflamatorio de neutrófilos (525).

En el estudio 5 no hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de nanopartículas de Ti entre las ratas del grupo experimental y las del control. Las nanopartículas detectadas en los órganos de las ratas tenían una masa mucho mayor que las halladas en los blancos de digestión; sin embargo, estas nanopartículas presentaron una masa muy similar entre el grupo experimental y control. Este hallazgo apoya la idea de que el omnipresente Ti ambiental puede ser incorporado por las ratas a través de la alimentación, el agua, el contacto con materiales, etc. Por lo tanto, los resultados del estudio 5 muestran que las nanopartículas de TiO_2 producidas y transportadas desde los residuos metálicos de la implantoplastia hacia la mayoría de los órganos analizados son muy pocas o demasiado pequeñas para ser detectadas con la estrategia analítica utilizada. También es posible que el tiempo de estudio fuera muy corto para observar una translocación de estas nanopartículas a los órganos diana. Según Bruno y cols. (524) la exposición crónica a este metal (12 meses)

produce mayores alteraciones y mayor acumulación que la exposición aguda (3 meses).

Es importante mencionar que la interpretación de los resultados en el cerebro y el bazo es ligeramente distinta. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, la mayor masa de Ti en los eventos obtenidos parecía señalar la presencia de diferentes nanopartículas de Ti en el cerebro y el bazo en comparación con el grupo control. Esto puede indicar una producción de nanopartículas de Ti de mayor tamaño debido al aumento de los niveles de Ti (como se demostró en la cuantificación del Ti iónico total) o una acumulación de partículas más grandes que son transportadas desde el lugar de la implantación. De hecho, las mediciones preliminares de TEM de los extractos revelaron la presencia de pequeños agregados de partículas que podrían atribuirse a las nanopartículas de Ti, sin embargo, no se pudo realizar el análisis elemental.

Una de las ventajas de la SP-ICP-MS es que es teóricamente posible cuantificar la forma iónica del elemento al mismo tiempo que su forma nanoparticulada. Sin embargo, esto no fue posible en el estudio 5 debido a los bajos rendimientos de extracción del Ti iónico en las condiciones de la digestión enzimática. De hecho, el tampón de digestión enzimática, con un pH ligeramente básico (7.4 – 8.2), provoca una disolución muy deficiente del Ti iónico contenido en las muestras y tanto los controles como las muestras experimentales muestran intensidades de fondo, que corresponden al Ti iónico, muy similares a los blancos de digestión. Esta observación subraya la importancia de utilizar la mezcla ácida optimizada aplicada para la digestión de las muestras en el procedimiento de determinación del Ti iónico total.

La agregación y el área superficial de los materiales nanoparticulados pueden cambiar una vez se introducen en el medio biológico. Las nanopartículas pueden agregarse en

un tamaño similar al de las micropartículas y alterar su propia identidad por parte del hospedador; de este modo, se reduce significativamente la respuesta inflamatoria (526,527). La comprensión de los efectos biológicos de las partículas de diferente tamaño en los tejidos periimplantarios y en el organismo humano es un nuevo reto para los estudios de nanotoxicología y biocompatibilidad (524).

En resumen, los resultados de los estudios 4 y 5 permiten aceptar parcialmente la hipótesis₅ ya que sí que hubo una diseminación de iones metálicos desde el defecto mandibular a distintos órganos de los animales de experimentación. Sin embargo, aunque parece que pueda haber una diseminación de nanopartículas al cerebro y al bazo de las ratas, con la metodología actual no se pudo encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.

- Limitaciones y futuras líneas de investigación

Las limitaciones generales de los trabajos que componen la presente tesis doctoral están relacionadas con el diseño de los estudios y la muestra analizada. En primer lugar, la caracterización fisicoquímica de partículas de Ti en aleación se llevó a cabo sin contaminarlas con un biofilm oral. En la cavidad bucal residen un gran número de bacterias del microbioma de los humanos. El biofilm bacteriano puede modificar las propiedades fisicoquímicas y favorecer la corrosión del Ti por lo que los resultados encontrados en nuestras investigaciones podrían ser incluso peores (528). Por lo tanto, sería interesante evaluar el efecto sinérgico que probablemente se producirá entre el proceso de mecanizado de la implantoplastia y los productos bacterianos sobre las partículas de la implantoplastia y sobre el implante pulido que permanece en boca.

En todos los ensayos se utilizaron partículas metálicas de Ti6Al4V de un solo tipo de implante. Puesto que existen diferentes tratamientos superficiales y otros materiales de implantes a los que también se les practica la implantoplastia, sería interesante replicar nuestra metodología, pero utilizando Ti c.p. con distintos tratamientos de superficie o bien, Ti-Zr. Este trabajo serviría para comprobar si el material tiene un efecto sobre las variables estudiadas.

Por otro lado, también existe una limitación general relacionada con el diseño de los estudios que componen esta tesis doctoral. Los estudios in vitro y en animales están en la zona baja de la pirámide de la evidencia científica y se caracterizan por presentar una gran validez interna pero una escasa validez externa. Sin embargo, es importante mencionar que no se podrían haber alcanzado los objetivos de la tesis sin este tipo de metodología y que estos estudios siempre son el paso previo que justificaría un estudio en humanos.

En relación con las limitaciones específicas, es importante conocer los antecedentes y los problemas que nos encontramos para desarrollar cada estudio. En el estudio 1 al ser un trabajo descriptivo de caracterización fisicoquímica no hubo más limitaciones que las ya comentadas como limitaciones generales.

En el estudio 2 se estudió un Ti particulado que representaba un problema para los ensayos de corrosión ya que se debía diseñar un método para que la corriente eléctrica aplicada pudiera pasar a través de la muestra. En un primer momento se llevaron a cabo distintos ensayos que consistieron en embeber estas partículas en una cera polimérica pero no se consiguieron buenos resultados ya que siempre había vacíos de conducción. Posteriormente la estrategia que permitió llevar a cabo los ensayos de corrosión fue someter a una deformación en frío el material original sin particular justo antes de la fractura de la aleación. Para asegurarnos de estar ensayando muestras con las mismas condiciones, se hicieron las pruebas de

nanodureza y módulo elástico y se obtuvo los mismos resultados que en la muestra de partículas de la implantoplastia. Por tanto, podemos confirmar que los discos utilizados deformados en frío tienen las mismas características que las partículas de implantoplastia por lo que nos permitió cumplir con la normativa y poder determinar de la resistencia a la corrosión. No obstante, se debe tener en cuenta que un material particulado con una gran superficie específica reacciona más con el electrolito, por lo que seguramente los resultados de la corrosión sean incluso peores en el entorno clínico periimplantario.

Respecto a las limitaciones del estudio 3 se debe considerar que, aunque seguimos la norma ISO 10993-5 para la realización de ensayos celulares, debido a la naturaleza y a la complejidad del proceso inflamatorio, creemos que los estudios in vivo son más adecuados para evaluar la respuesta inmunológica provocada por las partículas de Ti liberadas durante la implantoplastia. No obstante, el estudio 3 es una primera aproximación en la que se ha podido determinar la expresión de genes y marcadores pro-inflamatorios y anti-osteogénicos. En segundo lugar, se ha observado que las células THP-1 que se utilizaron no tienen el mismo comportamiento que los macrófagos humanos (419). Sin embargo, es importante destacar que la homogeneidad genética de esta línea celular disminuye la variabilidad en el fenotipo celular, lo que facilita la reproductibilidad de los resultados (419,420). Por último, tal y como hemos comprobado en los estudios 1 y 2, la implantoplastia cambia las propiedades fisicoquímicas del metal y lo hace más susceptible a la corrosión, por lo que una comparación más justa hubiera sido con Ti c.p. obtenido por implantoplastia.

Las limitaciones de los estudios 4 y 5 son compartidas ya que utilizamos el mismo modelo animal y, por lo tanto, la misma metodología. La primera está relacionada con el corto tiempo de estudio, que fue de 30 días desde la implantación de partículas

metálicas de la implantoplastia en el defecto mandibular de la rata. La acumulación de iones debería aumentar a lo largo del tiempo tal y como se ha visto en las prótesis articulares. Sin embargo, se desconoce el efecto que provocan estos residuos metálicos a medio o largo plazo en nuestro modelo. En segundo lugar, rellenar un defecto óseo con partículas de la implantoplastia no parece un modelo que imite exactamente la situación clínica real. Sin embargo, la movilización de los iones metálicos desde el sitio implantado hasta los órganos y la reacción local simulan un escenario clínico, en el que los restos no pueden ser eliminados completamente del campo quirúrgico. En tercer lugar, la presencia de iones de Ti, Al y V podría proceder de otras fuentes, y las variaciones de estos iones podrían no explicarse únicamente por la presencia de las partículas metálicas de la implantoplastia, aunque este mismo condicionante se encontraría en los registros tomados en humanos y en las ratas del grupo control. El mayor problema para la cuantificación del Ti y del Al ya sea en su forma iónica o nanoparticulada, es la ubiquidad del elemento en el entorno. Dicho de otro modo, estos elementos son difíciles de medir debido a los altos fondos ambientales que provienen, muy probablemente, de los alimentos y el agua potable. De hecho, incluso los pacientes sin implantes dentales ni prótesis articulares presentan ciertos niveles de Ti en la sangre. El dióxido de Ti es un aditivo alimentario común, el E171, (también para los seres humanos), aunque recientemente ha sido prohibido por la Unión Europea (UE) (529). Además, la presencia de Ti en las aguas está bien documentada (529). Por lo tanto, se espera que las pequeñas variaciones debidas a las partículas metálicas de Ti por encima de los blancos relativamente altos dificulten el análisis de ultratrazas. Pueden darse razones similares para la determinación del Al. No obstante, independientemente de la contaminación ambiental, el estudio 4 ha permitido demostrar que después de insertar los residuos metálicos de la implantoplastia en un defecto mandibular, la concentración de iones metálicos aumentó en algunos órganos.

Por último, el trabajo experimental se diseñó con tres grupos de estudio: experimental, control positivo y control negativo. La introducción de partículas de Ti6Al4V generadas por implantoplastia en un defecto mandibular aumentó la concentración de algunos metales en órganos a distancia respecto al control positivo. Sin embargo, no hubo diferencias en comparación al control negativo. Esto puede deberse a las dificultades ya explicadas para rastrear los iones metálicos liberados de la muestra de implantoplastia. Por otro lado, creemos que el hecho de que estas ratas no fueron intervenidas implica que no tuvieron problemas para beber o comer, lo que podría estar influyendo en los resultados. Sin embargo, se debe considerar que en el grupo control negativo solo hubo dos ratas, por lo que futuros estudios tendrían que aumentar sensiblemente la muestra de control negativo y validar el modelo experimental.

Una vez se han expuesto las limitaciones y los resultados de los estudios que componen esta tesis doctoral y la línea de investigación PIS/01596, creemos que se han abierto otras puertas para seguir evaluando los efectos biológicos y celulares de la implantoplastia. En este sentido, el día 27 de julio del 2022 se publicó la resolución de concesión de los Proyectos de I+D+I en Salud del Instituto de Salud Carlos III. Se ha conseguido financiación para continuar con esta línea de investigación con el proyecto que lleva como título “Evaluación de la bioseguridad de la implantoplastia en el tratamiento de la periimplantitis. Parte 2: Caracterización y análisis del daño genético de las partículas metálicas de la implantoplastia” (Número de expediente PI22/008851, Co-IP Prof.^a Dra. M^a Àngels Sánchez Garcés e IP Prof. Dr. Rui Figueiredo).

Mediante este proyecto se pretende llevar a cabo los primeros estudios in vivo sobre los efectos de la penetración intracelular de las nanopartículas contaminadas procedentes de la implantoplastia y determinar si éstas causan daño o mutaciones en

el DNA de las células del tejido periimplantario. La contaminación de la muestra con un biofilm periodontopatógeno permitirá aproximar el modelo a una situación clínica más real. Entre las pruebas de genotoxicidad disponibles, los ensayos Comet y de microRNA son reconocidos por su robustez, sensibilidad y poder estadístico para evaluar roturas y alteraciones de las cadenas de DNA, las cuales pueden ser consideradas características de mutagenicidad.

Por otro lado, también se evaluará el efecto que puede tener la corrosión bacteriana sobre las propiedades fisicoquímicas del implante pulido que permanece en boca después del tratamiento de implantoplastia. Esto es especialmente importante ya que el desgaste mecánico producido por la implantoplastia y la corrosión bacteriana pueden actuar de forma sinérgica y comprometer la biocompatibilidad del implante que permanece en la boca. Si bien ya existen estudios que han analizado estos parámetros (365,371), ninguno de éstos ha considerado valorar el efecto de la corrosión bacteriana.

Futuros trabajos deberán estudiar el proceso inflamatorio que ocurre en el tejido conectivo subepitelial ante la exposición de estas partículas metálicas de la implantoplastia mediante el análisis de marcadores de la inflamación y la osteoclastogénesis. En este sentido, ya se ha comprobado que las bacterias inducen procesos inflamatorios mediante la activación de los TLRs. Sin embargo, la activación de la vía del inflamasoma por partículas de Ti no se ha explorado y podría tener un papel importante en el desarrollo de las enfermedades periimplantarias (445).

8. Conclusiones

1. Las partículas metálicas generadas por implantoplastia presentaron una morfología irregular, diferente tamaño de partícula y claros signos de deformación. Además, la liberación de iones de V fue considerablemente más elevada en comparación al Ti y al Al y no pareció saturarse durante el periodo de estudio. Las partículas metálicas generadas por implantoplastia produjeron una reducción significativa de la viabilidad de las células fibroblásticas y osteoblásticas.
2. Las partículas de la aleación Ti6Al4V liberadas durante la implantoplastia muestran una mayor dureza, resistencia mecánica y tensiones residuales de compresión que el implante dental sin modificar. Estas partículas metálicas presentaron peores valores de resistencia a la corrosión en comparación con el implante dental sin modificar. Además, las imágenes de microscopía electrónica demostraron que existían picaduras en la superficie de las partículas metálicas de la implantoplastia.
3. Las partículas metálicas de Ti6Al4V y de Ti c.p. aumentaron la expresión de los marcadores proinflamatorios IL1 β y TNF α . A su vez, las partículas de Ti6Al4V generadas por la implantoplastia redujeron la expresión de los marcadores osteogénicos Runx2 y OC.
4. Un mes después de la implantación de las partículas metálicas de Ti6Al4V generadas por implantoplastia se observó una reacción granulomatosa a cuerpo extraño con la presencia de histiocitos y células gigantes multinucleadas. Algunas partículas de Ti6Al4V se encontraron dentro del citoplasma de las células gigantes multinucleadas.
5. Las partículas metálicas de la implantoplastia colocadas en un defecto mandibular durante 30 días aumentaron la concentración de iones de Ti en el hígado, bazo y cerebro. También se incrementó la concentración de iones de V en el cerebro de

los animales del grupo experimental. Aunque parece que en el cerebro y el bazo hubo una translocación de nanopartículas de Ti de mayor tamaño, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. La metodología actual y la alta contaminación ambiental hacen difícil la determinación de nanopartículas en los tejidos.

9. Referencias

1. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1977;16:1–132.
2. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983;50:399–410.
3. Abraham CM. A brief historical perspective on dental implants, their surface coatings and treatments. *Open Dent J.* 2014;8:50–5.
4. Listgarten MA, Mao R, Robinson PJ. Periodontal probing and the relationship of the probe tip to periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976;47:511–3.
5. Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. *Periodontol 2000.* 2008;47:15–26.
6. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981;52:155–70.
7. Schroeder A, Stich H, Straumann F, Sutter F. Über die Anlagerung von Osteozement an einen belasteten Implantatkörper [The accumulation of osteocementum around a dental implant under physical loading]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd.* 1978;88:1051–8.
8. Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg.* 1981;9:15–25.
9. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003;67:932–49.
10. Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. Osseointegration - Communication of cells. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23:1127–35.
11. Adell R. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981;10:387–416.
12. Nicolas-Silvente AI, Velasco-Ortega E, Ortiz-Garcia I, Monsalve-Guil L, Gil J,

- Jimenez-Guerra A. Influence of the titanium implant surface treatment on the surface roughness and chemical composition. *Materials (Basel)*. 2020;13:314.
13. Elani HW, Starr JR, Da Silva JD, Gallucci GO. Trends in dental implant use in the U.S., 1999-2016, and projections to 2026. *J Dent Res*. 2018;97:1424-30.
 14. Misch CM. Editorial: The global dental implant market: Everything has a price. *Int J Oral Implantol (Berl)*. 2020;13:311–2.
 15. The glossary of prosthodontic terms: Ninth edition. *J Prosthet Dent*. 2017;117:1–105.
 16. Shah FA, Trobos M, Thomsen P, Palmquist A. Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants - Is one truly better than the other? *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;62:960–6.
 17. Cordeiro JM, Faverani LP, Grandini CR, Rangel EC, da Cruz NC, Nociti Junior FH, et al. Characterization of chemically treated Ti-Zr system alloys for dental implant application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018;92:849–61.
 18. Cionca N, Hashim D, Mombelli A. Zirconia dental implants: Where are we now, and where are we heading? *Periodontol 2000*. 2017;73:241–58.
 19. McCracken M. Dental implant materials: Commercially pure titanium and titanium alloys. *J Prosthodont*. 1999;8:40–3.
 20. Liu X, Chen S, Tsoi JKH, Matinlinna JP. Binary titanium alloys as dental implant materials-A review. *Regen Biomater*. 2017;4:315–23.
 21. Nicholson J.W. Titanium alloys for dental implants: A review. *Prosthesis*. 2020;2:100–16.
 22. Richter EJ. In vivo vertical forces on implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10:99–108.
 23. Steinebrunner L, Wolfart S, Ludwig K, Kern M. Implant-abutment interface design affects fatigue and fracture strength of implants. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19:1276–84.

24. Shemtov-Yona K, Rittel D, Levin L, Machtei EE. The effect of oral-like environment on dental implants' fatigue performance. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25:166–70.
25. Elias CN, Fernandes DJ, Souza FM De, Monteiro EDS, Biasi RS De. Mechanical and clinical properties of titanium and titanium-based alloys (Ti G2, Ti G4 cold worked nanostructured and Ti G5) for biomedical applications. *J Mater Res Technol*. 2019;8:1060–9.
26. Valente NA, Marchio V, Troiano G, Gasparro R, Balice P, Marenzi G, et al. Narrow-diameter versus standard-diameter implants placed in horizontally regenerated bone in the rehabilitation of partially and completely edentulous patients: A systematic review. *Int J Oral Implantol (Berl)*. 2022;15:11–33.
27. Cordeiro JM, Barão VAR. Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;71:1201–15.
28. Correa DR, Vicente FB, Donato TA, Arana-Chavez VE, Buzalaf MA, Grandini CR. The effect of the solute on the structure, selected mechanical properties, and biocompatibility of Ti-Zr system alloys for dental applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;34:354–9.
29. Gil FJ, Planell JA, Padrós A. Fracture and fatigue behavior of shot-blasted titanium dental implants. *Implant Dent*. 2002;11:28–32.
30. Steinemann SG. Titanium--the material of choice? *Periodontol 2000*. 1998;17:7–21.
31. Simion M, Nevins M, Rasperini G, Tironi F. A 13- to 32-year retrospective study of bone stability for machined dental implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2018;38:489–93.
32. Chrcanovic BR, Kisch J, Albrektsson T, Wennerberg A. A retrospective study on clinical and radiological outcomes of oral implants in patients followed up for a minimum of 20 years. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018;20:199–207.

33. Kuromoto NK, Simão RA, Soares GA. Titanium oxide films produced on commercially pure titanium by anodic oxidation with different voltages. *Mater Charact.* 2007;58:114–21.
34. Prando D, Brenna A, Diamanti MV, Beretta S, Bolzoni F, Ormellese M, et al. Corrosion of titanium: Part 1: Aggressive environments and main forms of degradation. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2017;15:291–302.
35. Prando D, Brenna A, Diamanti MV, Beretta S, Bolzoni F, Ormellese M, et al. Corrosion of titanium: Part 2: Effects of surface treatments. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2018;16:3–13.
36. Virtanen S, Milosev I, Gomez-Barrena E, Trebse R, Salo J, Konttinen YT. Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions. *Acta Biomater.* 2008;4:468–76.
37. Kotsakis GA, Romanos GE. Biological mechanisms underlying complications related to implant site preparation. *Periodontol 2000.* 2022;88:52–63.
38. Noubissi S, Scarano A, Gupta S. A literature review study on atomic ions dissolution of titanium and its alloys in implant dentistry. *Materials (Basel).* 2019;12:368.
39. Olmedo DG, Tasat DR, Duffó G, Guglielmotti MB, Cabrini RL. The issue of corrosion in dental implants: A review. *Acta Odontol Latinoam.* 2009;22:3–9.
40. Apaza-Bedoya K, Tarce M, Benfatti CAM, Henriques B, Mathew MT, Teughels W, et al. Synergistic interactions between corrosion and wear at titanium-based dental implant connections: A scoping review. *J Periodontal Res.* 2017;52:946–54.
41. Berbel LO, Banczek EDP, Karoussis IK, Kotsakis GA, Costa I. Determinants of corrosion resistance of Ti-6Al-4V alloy dental implants in an in vitro model of peri-implant inflammation. *PLoS One.* 2019;14:e0210530.
42. Ottria L, Lauritano D, Andreasi Bassi M, Palmieri A, Candotto V, Tagliabue A, et

- al. Mechanical, chemical and biological aspects of titanium and titanium alloys in implant dentistry. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2018;32:81–90.
43. Mombelli A, Hashim D, Cionca N. What is the impact of titanium particles and biocorrosion on implant survival and complications? A critical review. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29:37–53.
 44. Mathew MT, Kerwell S, Lundberg HJ, Sukotjo C, Mercuri LG. Tribocorrosion and oral and maxillofacial surgical devices. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014;52:396–400.
 45. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007;23:844–54.
 46. Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *Biomed Res Int*. 2015;2015:791725.
 47. Rupp F, Scheideier L, Olshanska N, De Wild M, Wieland M, Geis-Gerstorfer J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2006;76:323–34.
 48. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont*. 2004;17:536–43.
 49. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--Review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont*. 2004;17:544–64.
 50. Johnson BW. HA-coated dental implants: Long-term consequences. *J Calif Dent Assoc*. 1992;20:33–41.
 51. Aglietta M, Siciliano VI, Rasperini G, Cafiero C, Lang NP, Salvi GE. A 10-year retrospective analysis of marginal bone-level changes around implants in periodontally healthy and periodontally compromised tobacco smokers. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22:47–53.
 52. Vercaigne S, Wolke JGC, Naert I, Jansen JA. Bone healing capacity of titanium

plasma-sprayed and hydroxylapatite-coated oral implants. Clin Oral Implants Res. 1998;9:261–71.

53. Jung UW, Hwang JW, Choi DY, Hu KS, Kwon MK, Choi SH, et al. Surface characteristics of a novel hydroxyapatite-coated dental implant. J Periodontal Implant Sci. 2012;42:59–63.
54. Rocci M, Rocci A, Martignoni M, Albrektsson T, Barlattani A, Gargari M. Comparing the TiOblast and Osseospeed surfaces. Histomorphometric and histological analysis in humans. Oral Implantol (Rome). 2008;1:34–42.
55. Sul YT, Byon E, Wennerberg A. Surface characteristics of electrochemically oxidized implants and acid-etched implants: Surface chemistry, morphology, pore configurations, oxide thickness, crystal structure, and roughness. Int J Oral Maxillofac Implant. 2008;23:631–40.
56. Donati M, Ekestubbe A, Lindhe J, Wennström JL. Marginal bone loss at implants with different surface characteristics - A 20-year follow-up of a randomized controlled clinical trial. Clin Oral Implants Res. 2018;29:480–7.
57. Jacobs R, Pittayapat P, van Steenberghe D, De Mars G, Gijbels F, Van Der Donck A, et al. A split-mouth comparative study up to 16 years of two screw-shaped titanium implant systems. J Clin Periodontol. 2010;37:1119–27.
58. Lin HY, Liu Y, Wismeijer D, Crielaard W, Deng DM. Effects of oral implant surface roughness on bacterial biofilm formation and treatment efficacy. Int J Oral Maxillofac Implants. 2013;28:1226–31.
59. De Bruyn H, Christiaens V, Doornewaard R, Jacobsson M, Cosyn J, Jacquet W, et al. Implant surface roughness and patient factors on long-term peri-implant bone loss. Periodontol 2000. 2017;73:218–27.
60. Mouhyi J, Dohan Ehrenfest DM, Albrektsson T. The peri-implantitis: Implant surfaces, microstructure, and physicochemical aspects. Clin Implant Dent Relat Res. 2012;14:170–83.

61. Renvert S, Polyzois I, Claffey N. How do implant surface characteristics influence peri-implant disease? *J Clin Periodontol*. 2011;38:214–22.
62. Hoyos-Nogués M, Buxadera-Palomero J, Ginebra MP, Manero JM, Gil FJ, Mas-Moruno C. All-in-one trifunctional strategy: A cell adhesive, bacteriostatic and bactericidal coating for titanium implants. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;169:30–40.
63. Hoyos-Nogués M, Velasco F, Ginebra MP, Manero JM, Gil FJ, Mas-Moruno C. Regenerating bone via multifunctional coatings: The blending of cell integration and bacterial inhibition properties on the surface of biomaterials. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9:21618–30.
64. Buxadera-Palomero J, Godoy-Gallardo M, Molmeneu M, Punset M, Gil FJ. Antibacterial properties of triethoxysilylpropyl succinic anhydride silane (TESPSA) on titanium dental implants. *Polymers (Basel)*. 2020;12:773.
65. Godoy-Gallardo M, Manzanares-Céspedes MC, Sevilla P, Nart J, Manzanares N, Manero JM, et al. Evaluation of bone loss in antibacterial coated dental implants: An experimental study in dogs. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;69:538–45.
66. Yeo IL. Modifications of dental implant surfaces at the micro- and nano-level for enhanced osseointegration. *Materials (Basel)*. 2019;13:89.
67. Ivanovski S, Lee R. Comparison of peri-implant and periodontal marginal soft tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2018;76:116–30.
68. Berglundh T, Abrahamsson I, Welander M, Lang NP, Lindhe J. Morphogenesis of the peri-implant mucosa: An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18:1–8.
69. Lindhe J, Berglundh T. The interface between the mucosa and the implant. *Periodontol 2000*. 1998;17:47–54.
70. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res*. 1991;2:81–90.

71. Gould TR, Westbury L, Brunette DM. Ultrastructural study of the attachment of human gingiva to titanium in vivo. *J Prosthet Dent.* 1984;52:418–20.
72. Tomasi C, Tessarolo F, Caola I, Wennström J, Nollo G, Berglundh T. Morphogenesis of peri-implant mucosa revisited: An experimental study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25:997–1003.
73. Araujo MG, Lindhe J. Peri-implant health. *J Periodontol.* 2018;89:S249–56.
74. Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Higginbottom FL, Buser D. Biologic width around titanium implants. A histometric analysis of the implanto-gingival junction around unloaded and loaded nonsubmerged implants in the canine mandible. *J Periodontol.* 1997;68:186–98.
75. Berglundh T, Lindhe J. Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited. *J Clin Periodontol.* 1996;23:971–3.
76. Suárez-López Del Amo F, Lin GH, Monje A, Galindo-Moreno P, Wang HL. Influence of soft tissue thickness on peri-implant marginal bone loss: A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2016;87:690–9.
77. Berglundh T, Lindhe J, Jonsson K, Ericsson I. The topography of the vascular systems in the periodontal and peri-implant tissues in the dog. *J Clin Periodontol.* 1994;21:189–93.
78. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem.* 2012;45:863–73.
79. Moraschini V, Poubel LA da C, Ferreira VF, Barboza E dos SP. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44:377–88.
80. Pjetursson BE, Heimisdottir K. Dental implants - Are they better than natural teeth? *Eur J Oral Sci.* 2018;126:81–7.
81. Tomasi C, Derks J. Etiology, occurrence, and consequences of implant loss.

Periodontol 2000. 2022;88:13–35.

82. Goodacre CJ, Bernal G, Rungcharassaeng K, Kan JYK. Clinical complications with implants and implant prostheses. *J Prosthet Dent*. 2003;90:121–32.
83. Ravidà A, Saleh MHA, Muriel MC, Maska B, Wang HL. Biological and technical complications of splinted or nonsplinted dental implants: A decision tree for selection. *Implant Dent*. 2018;27:89–94.
84. Heitz-Mayfield LJ, Aaboe M, Araujo M, Carrion JB, Cavalcanti R, Cionca N, et al. Group 4 ITI consensus report: Risks and biologic complications associated with implant dentistry. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29:351–8.
85. Sánchez-Torres A, Cercadillo-Ibarguren I, Figueiredo R, Gay-Escoda C, Valmaseda-Castellón E. Mechanical complications of implant-supported complete-arch restorations and impact on patient quality of life: A retrospective cohort study. *J Prosthet Dent*. 2021;125:279–86.
86. Hanif A, Qureshi S, Sheikh Z, Rashid H. Complications in implant dentistry. *Eur J Dent*. 2017;11:135–40.
87. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1986;1:11–25.
88. Misch CE, Perel ML, Wang HL, Sammartino G, Galindo-Moreno P, Trisi P, et al. Implant success, survival, and failure: The International Congress of Oral Implantologists (ICOI) Pisa consensus conference. *Implant Dent*. 2008;17:5–15.
89. Papaspyridakos P, Chen CJ, Singh M, Weber HP, Gallucci GO. Success criteria in implant dentistry: A systematic review. *J Dent Res*. 2012;91:242–8.
90. Needleman I, Chin S, O'Brien T, Petrie A, Donos N. Systematic review of outcome measurements and reference group(s) to evaluate and compare implant success and failure. *J Clin Periodontol*. 2012;39:122–32.
91. Galindo-Moreno P, León-Cano A, Ortega-Oller I, Monje A, O'valle F, Catena A. Marginal bone loss as success criterion in implant dentistry: Beyond 2 mm. *Clin*

Oral Implants Res. 2015;26:28–34.

92. Insua A, Monje A, Wang HL, Miron RJ. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2017;105:2075–89.
93. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007;40:251–64.
94. Hanada R, Hanada T, Sigl V, Schramek D, Penninger JM. RANKL/RANK-beyond bones. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89:647–56.
95. Feng X, Teitelbaum SL. Osteoclasts: New insights. *Bone Res*. 2013;1:11–26.
96. van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med*. 2004;199:805–14.
97. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011;26:229–38.
98. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:3–12.
99. Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system. *J Bone Miner Metab*. 2021;39:2–11.
100. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45:S313–8.
101. Seijas-Naya F, García-García A, Galindo-Moreno P, Gude-Sampedro F, Reboiras-López D, Rodríguez-Zorrilla S, et al. Influence of loading and drilling on marginal bone loss around implants with a dynamic bone management design: A single-blind, randomised, 12-month clinical trial. *Int J Oral Implantol (Berl)*. 2022;15:71–86.

102. Monje A, Insua A, Wang HL. Understanding peri-implantitis as a plaque-associated and site-specific entity: On the local predisposing factors. *J Clin Med*. 2019;8:279.
103. Kumar PS, Dabdoub SM, Hegde R, Ranganathan N, Mariotti A. Site-level risk predictors of peri-implantitis: A retrospective analysis. *J Clin Periodontol*. 2018;45:597–604.
104. Valles C, Rodríguez-Ciurana X, Clementini M, Baglivo M, Paniagua B, Nart J. Influence of subcrestal implant placement compared with equicrestal position on the peri-implant hard and soft tissues around platform-switched implants: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2018;22:555–70.
105. Linkevicius T, Puisys A, Steigmann M, Vindasiute E, Linkeviciene L. Influence of vertical soft tissue thickness on crestal bone changes around implants with platform switching: A comparative clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17:1228–36.
106. Linkevicius T, Apse P, Grybauskas S, Puisys A. The influence of soft tissue thickness on crestal bone changes around implants: A 1-year prospective controlled clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24:712–9.
107. Linkevicius T, Puisys A, Svediene O, Linkevicius R, Linkeviciene L. Radiological comparison of laser-microtextured and platform-switched implants in thin mucosal biotype. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26:599–605.
108. Canullo L, Tallarico M, Radovanovic S, Delibasic B, Covani U, Rakic M. Distinguishing predictive profiles for patient-based risk assessment and diagnostics of plaque induced, surgically and prosthetically triggered peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27:1243–50.
109. Schwarz F, Sahm N, Becker J. Impact of the outcome of guided bone regeneration in dehiscence-type defects on the long-term stability of peri-implant health: Clinical observations at 4 years. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23:191–6.
110. Galindo-Moreno P, Fernández-Jiménez A, Avila-Ortiz G, Silvestre FJ,

Hernández-Cortés P, Wang HL. Marginal bone loss around implants placed in maxillary native bone or grafted sinuses: A retrospective cohort study. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25:378–84.

111. Coli P, Jemt T. Are marginal bone level changes around dental implants due to infection? *Clin Implant Dent Relat Res.* 2021;23:170–7.
112. Galindo-Moreno P, Fauri M, Ávila-Ortiz G, Fernández-Barbero JE, Cabrera-León A, Sánchez-Fernández E. Influence of alcohol and tobacco habits on peri-implant marginal bone loss: A prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16:579–86.
113. Carr BR, Boggess WJ, Coburn JF, Chuang SK, Panchal N, Ford BP. Is alcohol consumption associated with protection against peri-implantitis? A retrospective cohort analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2020;78:76–81.
114. Hamdy AAE-MM, Ebrahim MAE-M. The effect of interleukin-1 allele 2 genotype (IL-1a(-889) and IL-1b(+3954)) on the individual's susceptibility to peri-implantitis: Case-control study. *J Oral Implantol.* 2011;37:325–34.
115. Laine ML, Leonhardt A, Roos-Jansåker A-MM, Peña AS, Van Winkelhoff AJ, Winkel EG, et al. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17:380–5.
116. García-Delaney C, Sánchez-Garcés MÁ, Figueiredo R, Sánchez-Torres A, Gay-Escoda C. Clinical significance of interleukin-1 genotype in smoking patients as a predictor of peri-implantitis: A case-control study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015;20:737–43.
117. Duarte PM, Serrão CR, Miranda TS, Zanatta LCS, Bastos MF, Faveri M, et al. Could cytokine levels in the peri-implant crevicular fluid be used to distinguish between healthy implants and implants with peri-implantitis? A systematic review. *J Periodontal Res.* 2016;51:689–98.
118. Turri A, Rossetti P, Canullo L, Grusovin M, Dahlin C. Prevalence of peri-

implantitis in medically compromised patients and smokers: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016;31:111–8.

119. Stavropoulos A, Bertl K, Winning L, Polyzois I. What is the influence of implant surface characteristics and/or implant material on the incidence and progression of peri-implantitis? A systematic literature review. *Clin Oral Implants Res*. 2021;32:203–29.
120. Camps-Font O, Rubianes-Porta L, Valmaseda-Castellón E, Jung RE, Gay-Escoda C, Figueiredo R. Comparison of external, internal flat-to-flat, and conical implant abutment connections for implant-supported prostheses: A systematic review and network meta-analysis of randomized clinical trials. *J Prosthet Dent*. 2021; Epub ahead of print.
121. Serino G, Ström C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: Association with inadequate plaque control. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20:169–74.
122. Yi Y, Koo KT, Schwarz F, Ben Amara H, Heo SJ. Association of prosthetic features and peri-implantitis: A cross-sectional study. *J Clin Periodontol*. 2020;47:392–403.
123. Schwarz F, Alcoforado G, Guerrero A, Jönsson D, Klinge B, Lang N, et al. Peri-implantitis: Summary and consensus statements of group 3. The 6th EAO consensus conference 2021. *Clin Oral Implants Res*. 2021;32:245–53.
124. Dalago HR, Schuldt Filho G, Rodrigues MAP, Renvert S, Bianchini MA. Risk indicators for peri-implantitis. A cross-sectional study with 916 implants. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28:144–50.
125. de Araújo Nobre M, Mano Azul A, Rocha E, Maló P. Risk factors of peri-implant pathology. *Eur J Oral Sci*. 2015;123:131–9.
126. Heijdenrijk K, Raghoobar GM, Meijer HJA, Stegenga B, van der Reijden WA. Feasibility and influence of the microgap of two implants placed in a non-submerged procedure: A five-year follow-up clinical trial. *J Periodontol*. 2006;77:1051–60.

127. Galindo-Moreno P, León-Cano A, Ortega-Oller I, Monje A, Suárez F, Ó Valle F, et al. Prosthetic abutment height is a key factor in peri-implant marginal bone loss. *J Dent Res*. 2014;93:80–5.
128. Chen W, Zhu WQ, Qiu J. Impact of exogenous metal ions on peri-implant bone metabolism: A review. *RSC Adv*. 2021;11:13152–63.
129. Peñarrocha-Diago MA, Flichy-Fernández AJ, Alonso-González R, Peñarrocha-Oltra D, Balaguer-Martínez J, Peñarrocha-Diago M. Influence of implant neck design and implant-abutment connection type on peri-implant health. Radiological study. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24:1192–200.
130. Borges T, Montero J, Leitão B, Pereira M, Galindo-Moreno P. Periimplant bone changes in different abutment heights and insertion timing in posterior mandibular areas: Three-year results from a randomized prospective clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2021;32:203–11.
131. Rodriguez MV, Ravidà A, Saleh MHA, Basma HS, Dukka H, Khurshid H, Wang HL, Moreno PG. Is the degree of physiological bone remodeling a predictive factor for peri-implantitis? *J Periodontol*. 2022;93:1273–82.
132. Ibañez C, Catena A, Galindo-Moreno P, Noguerol B, Magán-Fernández A, Mesa F. Relationship between long-term marginal bone loss and bone quality, implant width, and surface. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016;31:398–405.
133. Moraschini V, Kischinhevsky ICC, Sartoretto SC, de Almeida Barros Mourão CF, Sculean A, Calasans-Maia MD, et al. Does implant location influence the risk of peri-implantitis? *Periodontol 2000*. 2022; Epub ahead of print.
134. Galindo-Moreno P, Catena A, Pérez-Sayáns M, Fernández-Barbero JE, O'Valle F, Padial-Molina M. Early marginal bone loss around dental implants to define success in implant dentistry: A retrospective study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2022; Epub ahead of print.
135. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE. Peri-implant mucositis. *J Periodontol*.

2018;89:257–66.

136. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S267–90.
137. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 2018;89:S1–8.
138. Renvert S, Persson GR, Pirih FQ, Camargo PM. Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018;89:S304–12.
139. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Periodontol.* 2018;89:S267–90.
140. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014;16:155–65.
141. Baker JL, Bor B, Agnello M, Shi W, He X. Ecology of the oral microbiome: Beyond bacteria. *Trends Microbiol.* 2017;25:362–74.
142. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192:5002–17.
143. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH human microbiome project. *Genome Res.* 2009;19:2317–23.
144. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections – An update. *APMIS.* 2017;125:376–84.
145. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RLJ. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25:134–44.
146. Kolenbrander PE. Multispecies communities: Interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *Int J Oral Sci.* 2011;3:49–54.
147. Sedghi L, DiMassa V, Harrington A, Lynch SV, Kapila YL. The oral microbiome:

Role of key organisms and complex networks in oral health and disease.

Periodontol 2000. 2021;87:107–31.

148. Frédéric LJ, Michel B, Selena T. Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. *Materials (Basel)*. 2018;11:1802.
149. Renvert S, Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Renvert H, Rutger Persson G. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18:509–16.
150. Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Arch Oral Biol*. 2014;59:66–72.
151. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014;16:783–93.
152. Leonhardt Å, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res*. 1999;10:339–45.
153. Mombelli A, Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol*. 2011;38:203–13.
154. Mombelli A, van Oosten MAC, Schürch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol*. 1987;2:145–51.
155. Schwarz F, Becker K, Rahn S, Hegewald A, Pfeffer K, Henrich B. Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. *Int J Implant Dent*. 2015;1:9.
156. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: The key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*. 2005;76:2033–41.
157. Donath K, Laass M, Günzl HJ. The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;420:131–7.
158. Donath K. Pathogenesis of bony pocket formation around dental implants. *J Dent*

Assoc S Afr. 1992;47:204–8.

159. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? Clin Implant Dent Relat Res. 2014;16:155–65.
160. Albrektsson T, Jemt T, Mölne J, Tengvall P, Wennerberg A. On inflammation-immunological balance theory—A critical apprehension of disease concepts around implants: Mucositis and marginal bone loss may represent normal conditions and not necessarily a state of disease. Clin Implant Dent Relat Res. 2019;21:183–9.
161. Wilson TG Jr, Valderrama P, Burbano M, Blansett J, Levine R, Kessler H, Rodrigues DC. Foreign bodies associated with peri-implantitis human biopsies. J Periodontol. 2015;86:9–15.
162. Trindade R, Albrektsson T, Tengvall P, Wennerberg A. Foreign body reaction to biomaterials: On mechanisms for buildup and breakdown of osseointegration. Clin Implant Dent Relat Res. 2016;18:192–203.
163. Albrektsson T, Canullo L, Cochran D, De Bruyn H. “Peri-implantitis”: A Complication of a foreign body or a man-made “disease”. Facts and fiction. Clin Implant Dent Relat Res. 2016;18:840–9.
164. Albrektsson T, Chrcanovic B, Mölne J, Wennerberg A. Foreign body reactions, marginal bone loss and allergies in relation to titanium implants. Eur J Oral Implantol. 2018;11:37-46.
165. Fragkioudakis I, Tseleki G, Doufexi AE, Sakellari D. Current concepts on the pathogenesis of peri-implantitis: A narrative review. Eur J Dent. 2021;15:379–87.
166. Lang NP, Berglundh T, Heitz-Mayfield LJ, Pjetursson BE, Salvi GE, Sanz M. Consensus statements and recommended clinical procedures regarding implant survival and complications. Int J Oral Maxillofac Implants. 2004;19:150–4.
167. Carcuac O, Berglundh T. Composition of human peri-implantitis and periodontitis lesions. J Dent Res. 2014;93:1083–8.

168. Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *J Clin Periodontol*. 2011;38:188–202.
169. Wilson TG, Valderrama P, Burbano M, Blansett J, Levine R, Kessler H, et al. Foreign bodies associated with peri-implantitis human biopsies. *J Periodontol*. 2015;86:9–15.
170. Galindo-Moreno P, López-Martínez J, Caba-Molina M, Ríos-Pelegrina R, Torrecillas-Martínez L, Monje A, et al. Morphological and immunophenotypical differences between chronic periodontitis and peri-implantitis - A cross-sectional study. *Eur J Oral Implantol*. 2017;10:453-63.
171. Sanz M, Alandez J, Lazaro P, Calvo JL, Quirynen M, van Steenberghe D. Histopathologic characteristics of peri-implant soft tissues in Brånemark implants with 2 distinct clinical and radiological patterns. *Clin Oral Implants Res*. 1991;2:128–34.
172. Carcuac O, Abrahamsson I, Albouy JP, Linder E, Larsson L, Berglundh T. Experimental periodontitis and peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24:363–71.
173. Heitz-Mayfield LJA, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol 2000*. 2010;53:167–81.
174. Reinedahl D, Galli S, Albrektsson T, Tengvall P, Johansson CB, Hammarström Johansson P, et al. Aseptic ligatures induce marginal peri-implant bone loss—An 8-week trial in rabbits. *J Clin Med*. 2019;8:1248.
175. Gualini F, Berglundh T. Immunohistochemical characteristics of inflammatory lesions at implants. *J Clin Periodontol*. 2003;30:14–8.
176. Yeung AWK, Leung WK. Citation network analysis of dental implant literature from 2007 to 2016. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018;33:1240–6.
177. Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol*. 2015;42:S158–71.

178. Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: Systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017;62:1–12.
179. Rakic M, Galindo-Moreno P, Monje A, Radovanovic S, Wang HL, Cochran D, et al. How frequent does peri-implantitis occur? A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2018;22:1805–16.
180. Shimchuk AA, Weinstein BF, Daubert DM. The impact of a change in classification criteria on the prevalence of peri-implantitis: A cross-sectional analysis. *J Periodontol.* 2021;92:1339–46.
181. Aguirre-Zorzano LA, Estefanía-Fresco R, Telletxea O, Bravo M. Prevalence of peri-implant inflammatory disease in patients with a history of periodontal disease who receive supportive periodontal therapy. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26:1338–44.
182. Canullo L, Peñarrocha-Oltra D, Covani U, Botticelli D, Serino G, Penarrocha M. Clinical and microbiological findings in patients with peri-implantitis: A cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27:376–82.
183. Casado PL, Villas-Boas R, de Mello W, Duarte MEL, Granjeiro JM. Peri-implant disease and chronic periodontitis: Is interleukin-6 gene promoter polymorphism the common risk factor in a brazilian population? *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28:35–43.
184. Cecchinato D, Parpaiola A, Lindhe J. A cross-sectional study on the prevalence of marginal bone loss among implant patients. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24:87–90.
185. Daubert DM, Weinstein BF, Bordin S, Leroux BG, Flemming TF. Prevalence and predictive factors for peri-implant disease and implant failure: A cross-sectional analysis. *J Periodontol.* 2015;86:337–47.
186. Derks J, Schaller D, Håkansson J, Wennström JL, Tomasi C, Berglundh T. Effectiveness of implant therapy analyzed in a Swedish population: Prevalence of peri-implantitis. *J Dent Res.* 2016;95:43–9.

187. Dvorak G, Arnhart C, Heuberger S, Huber CD, Watzek G, Gruber R. Peri-implantitis and late implant failures in postmenopausal women: A cross-sectional study. *J Clin Periodontol*. 2011;38:950–5.
188. Ferreira SD, Silva GLM, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol*. 2006;33:929–35.
189. Fransson C, Lekholm U, Jemt T, Berglundh T. Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16:440–6.
190. Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *J Periodontol*. 2010;81:231–8.
191. Konstantinidis IK, Kotsakis GA, Gerdes S, Walter MH. Cross-sectional study on the prevalence and risk indicators of peri-implant diseases. *Eur J Oral Implantol*. 2015;8:75–88.
192. Marrone A, Lasserre J, Bercy P, Brex MC. Prevalence and risk factors for peri-implant disease in Belgian adults. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24:934–40.
193. Máximo M, de Mendonça A, Alves J, Cortelli S, Peruzzo D, Duarte PM. Peri-implant diseases may be associated with increased time loading and generalized periodontal bone loss: Preliminary results. *J Oral Implantol*. 2008;34:268–73.
194. Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C. Prevalence of peri-implant diseases. A cross-sectional study based on a private practice environment. *J Clin Periodontol*. 2012;39:490–4.
195. Papi P, Di Murro B, Pranno N, Bisogni V, Saracino V, Letizia C, Polimeni A, Pompa G. Prevalence of peri-implant diseases among an Italian population of patients with metabolic syndrome: A cross-sectional study. *J Periodontol*. 2019;90:1374–82.
196. Rodrigo D, Sanz-Sánchez I, Figuero E, Llodrá JC, Bravo M, Caffesse RG, et al.

- Prevalence and risk indicators of peri-implant diseases in Spain. *J Clin Periodontol.* 2018;45:1510–20.
197. Romandini M, Lima C, Pedrinaci I, Araoz A, Soldini MC, Sanz M. Prevalence and risk/protective indicators of peri-implant diseases: A university-representative cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2021;32:112–22.
 198. Vignoletti F, Di Domenico GL, Di Martino M, Montero E, de Sanctis M. Prevalence and risk indicators of peri-implantitis in a sample of university-based dental patients in Italy: A cross-sectional study. *J Clin Periodontol.* 2019;46:597–605.
 199. Zetterqvist L, Feldman S, Rotter B, Vincenzi G, Wennström JL, Chierico A, Stach RM, Kenealy JN. A prospective, multicenter, randomized-controlled 5-year study of hybrid and fully etched implants for the incidence of peri-implantitis. *J Periodontol.* 2010;81:493–501.
 200. Romandini M, Berglundh J, Derks J, Sanz M, Berglundh T. Diagnosis of peri-implantitis in the absence of baseline data: A diagnostic accuracy study. *Clin Oral Implants Res.* 2021;32:297–313.
 201. Schou S, Holmstrup P, Stoltze K, Hjørting-Hansen E, Fiehn NE, Skovgaard LT. Probing around implants and teeth with healthy or inflamed peri-implant mucosa/gingiva. A histologic comparison in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Clin Oral Implants Res.* 2002;13:113–26.
 202. García-García M, Mir-Mari J, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E. Probing single-tooth dental implants with and without prostheses: A cross-sectional study comparing healthy and peri-implant mucositis sites. *J Clin Periodontol.* 2021;48:581–9.
 203. Coli P, Christiaens V, Sennerby L, Bruyn H De. Reliability of periodontal diagnostic tools for monitoring peri-implant health and disease. *Periodontol* 2000. 2017;73:203–17.
 204. Monje A, Amerio E, Farina R, Nart J, Ramanauskaite A, Renvert S, et al.

Significance of probing for monitoring peri-implant diseases. *Int J Oral Implantol* (Berl). 2021;14:385–99.

205. Etter TH, Håkanson I, Lang NP, Trejo PM, Caffesse RG. Healing after standardized clinical probing of the perimplant soft tissue seal: A histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13:571–80.
206. Merli M, Bernardelli F, Giulianelli E, Toselli I, Mariotti G, Nieri M. Peri-implant bleeding on probing: A cross-sectional multilevel analysis of associated factors. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28:1401–5.
207. Monje A, Caballé-Serrano J, Nart J, Peñarrocha D, Wang HL, Rakic M. Diagnostic accuracy of clinical parameters to monitor peri-implant conditions: A matched case-control study. *J Periodontol*. 2018;89:407–17.
208. Dukka H, Saleh MHA, Ravidà A, Greenwell H, Wang HL. Is bleeding on probing a reliable clinical indicator of peri-implant diseases? *J Periodontol*. 2021;92:1669–74.
209. Hashim D, Cionca N, Combescure C, Mombelli A. The diagnosis of peri-implantitis: A systematic review on the predictive value of bleeding on probing. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29:276–93.
210. Fransson C, Wennström J, Berglundh T. Clinical characteristics at implants with a history of progressive bone loss. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19:142–7.
211. Monje A, Vera M, Muñoz-Sanz A, Wang HL, Nart J. Suppuration as diagnostic criterium of peri-implantitis. *J Periodontol*. 2021;92:216–24.
212. Lam EW, Ruprecht A, Yang J. Comparison of two-dimensional orthoradially reformatted computed tomography and panoramic radiography for dental implant treatment planning. *J Prosthet Dent*. 1995;74:42–6.
213. Benic GI, Sancho-Puchades M, Jung RE, Deyhle H, Hämmerle CHF. In vitro assessment of artifacts induced by titanium dental implants in cone beam computed tomography. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24:378–83.

214. García-García M, Mir-Mari J, Benic GI, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E. Accuracy of periapical radiography in assessing bone level in implants affected by peri-implantitis: A cross-sectional study. *J Clin Periodontol*. 2016;43:85–91.
215. Ritter L, Elger MC, Rothamel D, Fienitz T, Zinser M, Schwarz F, et al. Accuracy of peri-implant bone evaluation using cone beam CT, digital intra-oral radiographs and histology. *Dentomaxillofac Radiol*. 2014;43:20130088.
216. Insua A, Gañán Y, Macías Y, Garcia J, Rakic M, Monje A. Diagnostic accuracy of cone beam computed tomography in identifying peri-implantitis-like bone defects ex vivo. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2021;41:223–31.
217. Schwarz F, Herten M, Sager M, Bieling K, Sculean A, Becker J. Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18:161–70.
218. Monje A, Pons R, Insua A, Nart J, Wang HL, Schwarz F. Morphology and severity of peri-implantitis bone defects. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21:635–43.
219. Faot F, Nascimento GG, Bielemann AM, Campão TD, Leite FRM, Quirynen M. Can peri-implant crevicular fluid assist in the diagnosis of peri-implantitis? A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2015;86:631–45.
220. Alassy H, Parachuru P, Wolff L. Peri-Implantitis diagnosis and prognosis using biomarkers in peri-implant crevicular fluid: A narrative review. *Diagnostics (Basel)*. 2019;9:214.
221. Zani SR, Moss K, Shibli JA, Teixeira ER, de Oliveira Mairink R, Onuma T, et al. Peri-implant crevicular fluid biomarkers as discriminants of peri-implant health and disease. *J Clin Periodontol*. 2016;43:825–32.
222. Rakic M, Monje A, Radovanovic S, Petkovic-Curcin A, Vojvodic D, Tatic Z. Is the personalized approach the key to improve clinical diagnosis of peri-implant conditions? The role of bone markers. *J Periodontol*. 2020;91:859–69.
223. Figuero E, Graziani FF, Sanz I, Herrera D, Sanz M. Management of peri-implant

mucositis and peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2014;66:255–73.

224. John G, Becker J, Schwarz F. Modified implant surface with slower and less initial biofilm formation. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17:461–8.
225. Berglundh T, Gotfredsen K, Zitzmann NU, Lang NP, Lindhe J. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18:655–61.
226. Albouy JP, Abrahamsson I, Persson LG, Berglundh T. Spontaneous progression of peri-implantitis at different types of implants. An experimental study in dogs. I: clinical and radiographic observations. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19:997–1002.
227. Albouy JP, Abrahamsson I, Berglundh T. Spontaneous progression of experimental peri-implantitis at implants with different surface characteristics: An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2012;39:182–7.
228. Carcuac O, Abrahamsson I, Derks J, Petzold M, Berglundh T. Spontaneous progression of experimental peri-implantitis in augmented and pristine bone: A pre-clinical in vivo study. *Clin Oral Implants Res*. 2020;31:192–200.
229. Saulacic N, Schaller B. Prevalence of peri-implantitis in implants with turned and rough surfaces: A systematic review. *J Oral Maxillofac Res*. 2019;10:e1.
230. Arnhart C, Dvorak G, Trefil C, Huber C, Watzek G, Zechner W. Impact of implant surface topography: A clinical study with a mean functional loading time of 85 months. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24:1049–54.
231. Rocci A, Rocci M, Rocci C, Scoccia A, Gargari M, Martignoni M, et al. Immediate loading of Brånemark system TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible. Part II: A randomized open-ended 9-year follow-up clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28:891–5.
232. Jungner M, Lundqvist P, Lundgren S. A retrospective comparison of oxidized and

- turned implants with respect to implant survival, marginal bone level and peri-implant soft tissue conditions after at least 5 years in function. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014;16:230–7.
233. Vandeweghe S, Ferreira D, Vermeersch L, Mariën M, De Bruyn H. Long-term retrospective follow-up of turned and moderately rough implants in the edentulous jaw. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27:421–6.
 234. Suarez F, Monje A, Galindo-Moreno P, Wang HL. Implant surface detoxification: A comprehensive review. *Implant Dent.* 2013;22:465–73.
 235. Schou S, Berglundh T, Lang NP. Surgical treatment of peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19:140–9.
 236. Lin GH, Suárez-López Del Amo F, Wang HL. Laser therapy for treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: An American Academy of Periodontology best evidence review. *J Periodontol.* 2018;89:766–82.
 237. Schär D, Ramseier CA, Eick S, Arweiler NB, Sculean A, Salvi GE. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: Six-month outcomes of a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24:104–10.
 238. Schlee M, Wang HL, Stumpf T, Brodbeck U, Bosshardt D, Rathe F. Treatment of periimplantitis with electrolytic cleaning versus mechanical and electrolytic cleaning: 18-month results from a randomized controlled clinical trial. *J Clin Med.* 2021;10:3475.
 239. Figuero E, Graziani F, Sanz I, Herrera D, Sanz M. Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontol 2000.* 2014;66:255–73.
 240. Romeo E, Ghisolfi M, Murgolo N, Chiapasco M, Lops D, Vogel G. Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part I: Clinical outcome. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16:9–18.
 241. Albouy JP, Abrahamsson I, Persson LG, Berglundh T. Implant surface

characteristics influence the outcome of treatment of peri-implantitis: An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2011;38:58–64.

242. Amate-Fernández P, Figueiredo R, Blanc V, Álvarez G, León R, Valmaseda-Castellón E. Erythritol-enriched powder and oral biofilm regrowth on dental implants: An in vitro study. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal*. 2021;26:e602–10.
243. Faggion CM, Listl S, Frühauf N, Chang HJ, Tu YK. A systematic review and Bayesian network meta-analysis of randomized clinical trials on non-surgical treatments for peri-implantitis. *J Clin Periodontol*. 2014;41:1015–25.
244. Suárez-López Del Amo F, Yu SH, Wang HL. Non-surgical therapy for peri-implant diseases: A systematic review. *J Oral Maxillofac Res*. 2016;7:e13.
245. Muthukuru M, Zainvi A, Esplugues EO, Flemmig TF. Non-surgical therapy for the management of peri-implantitis: A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23:77–83.
246. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45:S286–91.
247. Blanco C, Pico A, Dopico J, Gándara P, Blanco J, Liñares A. Adjunctive benefits of systemic metronidazole on non-surgical treatment of peri-implantitis. A randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2022;49:15–27.
248. Nart J, Pons R, Valles C, Esmatges A, Sanz-Martín I, Monje A. Non-surgical therapeutic outcomes of peri-implantitis: 12-month results. *Clin Oral Investig*. 2020;24:675–82.
249. Park SH, Song YW, Cha JK, Lee JS, Kim YT, Shin HS, Lee DW, Lee JH, Kim CS. Adjunctive use of metronidazole-minocycline ointment in the non-surgical treatment of peri-implantitis: A multicenter randomized controlled trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2021;23:543–54.

250. Liñares A, Pico A, Blanco C, Blanco J. Adjunctive systemic metronidazole to non-surgical therapy of peri-implantitis with intrabony defects: A retrospective case series study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2019;34:1237–45.
251. Monje A, Schwarz F. Principles of combined surgical therapy for the management of peri-implantitis. *Clin Adv Periodontics*. 2022;12:57–63.
252. Monje A, Nart J. Management and sequelae of dental implant removal. *Periodontol 2000*. 2022;88:182–200.
253. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE, Mombelli A, Loup PJ, Heitz F, Kruger E, et al. Supportive peri-implant therapy following anti-infective surgical peri-implantitis treatment: 5-year survival and success. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29:1–6.
254. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW, et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23:327–34.
255. Carcuac O, Derks J, Abrahamsson I, Wennström JL, Petzold M, Berglundh T. Surgical treatment of peri-implantitis: 3-year results from a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2017;44:1294–303.
256. Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: Short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11:169–78.
257. Costa-Berenguer X, García-García M, Sánchez-Torres A, Sanz-Alonso M, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E. Effect of implantoplasty on fracture resistance and surface roughness of standard diameter dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29:46–54.
258. Camps-Font O, González-Barnadas A, Mir-Mari J, Figueiredo R, Gay-Escoda C, Valmaseda-Castellón E. Fracture resistance after implantoplasty in three implant-abutment connection designs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;25:691–9.
259. Ramel CF, Lüssi A, Özcan M, Jung RE, Hämmerle CHFF, Thoma DS. Surface

roughness of dental implants and treatment time using six different implantoplasty procedures. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27:776–81.

260. Rimondini L, Cicognani Simoncini F, Carrassi A. Micro-morphometric assessment of titanium plasma-sprayed coating removal using burs for the treatment of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11:129–38.
261. Beheshti Maal M, Aanerød Ellingsen S, Reseland JE, Verket A. Experimental implantoplasty outcomes correlate with fibroblast growth in vitro. *BMC Oral Health.* 2020;20:25.
262. Romeo E, Lops D, Chiapasco M, Ghisolfi M, Vogel G. Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part II: Radiographic outcome. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18:179–87.
263. Schwarz F, Sahm N, Iglhaut G, Becker J. Impact of the method of surface debridement and decontamination on the clinical outcome following combined surgical therapy of peri-implantitis: A randomized controlled clinical study. *J Clin Periodontol.* 2011;38:276–84.
264. Bianchini MA, Galarraga-Vinueza ME, Apaza-Bedoya K, De Souza JM, Magini R, Schwarz F. Two to six-year disease resolution and marginal bone stability rates of a modified resective-implantoplasty therapy in 32 peri-implantitis cases. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2019;21:758–65.
265. Bianchini M, Galarraga-Vinueza M, Bedoya K, Correa B, de Souza Magini R, Schwarz F. Implantoplasty enhancing peri-implant bone stability over a 3-year follow-up: A case series. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2020;40:e1–8.
266. Monje A, Pons R, Amerio E, Wang HL, Nart J. Resolution of peri-implantitis by means of implantoplasty as adjunct to surgical therapy: A retrospective study. *J Periodontol.* 2022;93:110–22.
267. Ravidà A, Siqueira R, Saleh I, Saleh MHA, Giannobile A, Wang HL. Lack of

- clinical benefit of implantoplasty to improve implant survival rate. *J Dent Res*. 2020;99:1348–55.
268. Stavropoulos A, Bertl K, Eren S, Gottfredsen K. Mechanical and biological complications after implantoplasty – A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2019;30:833–48.
 269. Beheshti Maal M, Verket A. Implantoplasty – Provoking or reducing inflammation?– A systematic scoping review. *Acta Odontol Scand*. 2022;80:105–16.
 270. Burgueño-Barris G, Camps-Font O, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E. The influence of implantoplasty on surface roughness, biofilm formation, and biocompatibility of titanium implants: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2021;36:1–34.
 271. Schwarz F, Mihatovic I, Golubovic V, Becker J, Sager M. Immunohistochemical characteristics of regenerated bone after surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects. *Clin Oral Investig*. 2014;18:1679–86.
 272. Aghazadeh A, Persson RG, Renvert S. Impact of bone defect morphology on the outcome of reconstructive treatment of peri-implantitis. *Int J Implant Dent*. 2020;6:33.
 273. Almohandes A, Carcuac O, Abrahamsson I, Lund H, Berglundh T. Re-osseointegration following reconstructive surgical therapy of experimental peri-implantitis. A pre-clinical in vivo study. *Clin Oral Implants Res*. 2019;30:447–56.
 274. Daugela P, Cicciu M, Saulacic N. Surgical regenerative treatments for peri-implantitis: Meta-analysis of recent findings in a systematic literature review. *J Oral Maxillofac Res*. 2016;7:e15.
 275. Rocuzzo M, Bonino F, Bonino L, Dalmaso P. Surgical therapy of peri-implantitis lesions by means of a bovine-derived xenograft: Comparative results of a prospective study on two different implant surfaces. *J Clin Periodontol*. 2011;38:738–45.

276. Aghazadeh A, Rutger Persson G, Renvert S. A single-centre randomized controlled clinical trial on the adjunct treatment of intra-bony defects with autogenous bone or a xenograft: Results after 12 months. *J Clin Periodontol*. 2012;39:666–73.
277. Nart J, de Tapia B, Pujol À, Pascual A, Valles C. Vancomycin and tobramycin impregnated mineralized allograft for the surgical regenerative treatment of peri-implantitis: A 1-year follow-up case series. *Clin Oral Investig*. 2018;22:2199–207.
278. Schwarz F, Sahm N, Bieling K, Becker J. Surgical regenerative treatment of peri-implantitis lesions using a nanocrystalline hydroxyapatite or a natural bone mineral in combination with a collagen membrane: A four-year clinical follow-up report. *J Clin Periodontol*. 2009;36:807–14.
279. Derks J, Ortiz-Vigón A, Guerrero A, Donati M, Bressan E, Ghensi P, et al. Reconstructive surgical therapy of peri-implantitis: A multicenter randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2022;33:921–44.
280. Wang HL, Boyapati L. "PASS" principles for predictable bone regeneration. *Implant Dent*. 2006;15:8-17.
281. Schwarz F, Jepsen S, Hertel M, Sager M, Rothamel D, Becker J. Influence of different treatment approaches on non-submerged and submerged healing of ligature induced peri-implantitis lesions: An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2006;33:584–95.
282. Monje A, Pons R, Rocuzzo A, Salvi GE, Nart J. Reconstructive therapy for the management of peri-implantitis via submerged guided bone regeneration: A prospective case series. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2020;22:342–50.
283. Wen SC, Barootchi S, Huang WX, Wang HL. Surgical reconstructive treatment for infraosseous peri-implantitis defects with a submerged healing approach: A prospective controlled study. *J Periodontol*. 2022;93:195–207.
284. La Monaca G, Pranno N, Annibali S, Cristalli MP, Polimeni A. Clinical and

radiographic outcomes of a surgical reconstructive approach in the treatment of peri-implantitis lesions: A 5-year prospective case series. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29:1025–37.

285. Roccuzzo M, Mirra D, Pittoni D, Ramieri G, Roccuzzo A. Reconstructive treatment of peri-implantitis infrabony defects of various configurations: 5-year survival and success. *Clin Oral Implants Res.* 2021;32:1209–17.
286. Schwarz F, Sahm N, Becker J. Combined surgical therapy of advanced peri-implantitis lesions with concomitant soft tissue volume augmentation. A case series. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25:132–6.
287. Monje A, Blasi G, Nart J, Urban IA, Nevins M, Wang HL. Soft tissue conditioning for the surgical therapy of peri-implantitis: A prospective 12-month study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2020;40:899-906.
288. Schwarz F, John G, Schmucker A, Sahm N, Becker J, Combined BJ, et al. Combined surgical therapy of advanced peri-implantitis evaluating two methods of surface decontamination: A 7-year follow-up observation. *J Clin Periodontol.* 2017;44:337–42.
289. Koldslund OC, Wohlfahrt JC, Aass AM. Surgical treatment of peri-implantitis: Prognostic indicators of short-term results. *J Clin Periodontol.* 2018;45:100–13.
290. de Waal YCM, Raghoobar GM, Meijer HJA, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Prognostic indicators for surgical peri-implantitis treatment. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27:1485–91.
291. Ravidà A, Siqueira R, Di Gianfilippo R, Kaur G, Giannobile A, Galindo-Moreno P, et al. Prognostic factors associated with implant loss, disease progression or favorable outcomes after peri-implantitis surgical therapy. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2022;24:222–32.
292. Carcuac O, Derks J, Abrahamsson I, Wennström JL, Berglundh T. Risk for recurrence of disease following surgical therapy of peri-implantitis—A prospective longitudinal study. *Clin Oral Implants Res.* 2020;31:1072–7.

293. Lagervall M, Jansson LE. Treatment outcome in patients with peri-implantitis in a periodontal clinic: A retrospective study. *J Periodontol*. 2013;84:1365–73.
294. Ramanauskaite A, Fretwurst T, Schwarz F. Efficacy of alternative or adjunctive measures to conventional non-surgical and surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Implant Dent*. 2021;7:112.
295. Tomasi C, Regidor E, Ortiz-Vigón A, Derks J. Efficacy of reconstructive surgical therapy at peri-implantitis-related bone defects. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2019;46:340–56.
296. Berglundh T, Jepsen S, Stadlinger B, Terheyden H. Peri-implantitis and its prevention. *Clin Oral Implants Res*. 2019;30:150–5.
297. Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, et al. Primary prevention of peri-implantitis: Managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol*. 2015;42:S152–7.
298. Monje A, Aranda L, Diaz KT, Alarcón MA, Bagramian RA, Wang HL, et al. Impact of maintenance therapy for the prevention of peri-implant diseases: A systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*. 2016;95:372–9.
299. Anitua E, Alkhraisat MH. 15-year follow-up of short dental implants placed in the partially edentulous patient: Mandible vs. maxilla. *Ann Anat*. 2019;222:88–93.
300. Adler L, Buhlin K, Jansson L. Survival and complications: A 9- to 15-year retrospective follow-up of dental implant therapy. *J Oral Rehabil*. 2020;47:67–77.
301. Hakki SS, Tatar G, Dundar N, Demiralp B. The effect of different cleaning methods on the surface and temperature of failed titanium implants: An in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2017;32:563–71.
302. Leitão-Almeida B, Camps-Font O, Correia A, Mir-Mari J, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E. Effect of crown to implant ratio and implantoplasty on the fracture resistance of narrow dental implants with marginal bone loss: An in

vitro study. BMC Oral Health. 2020;20:329.

303. Camps-Font O, Martín-Fatás P, Clé-Ovejero A, Figueiredo R, Gay-Escoda C, Valmaseda-Castellón E. Postoperative infections after dental implant placement: Variables associated with increased risk of failure. J Periodontol. 2018;89:1165–73.
304. Obando-Pereda GA, Fischer L, Stach-Machado DR. Titanium and zirconia particle-induced pro-inflammatory gene expression in cultured macrophages and osteolysis, inflammatory hyperalgesia and edema in vivo. Life Sci. 2014;97:96–106.
305. Fretwurst T, Nelson K, Tarnow DP, Wang HL, Giannobile WV. Is metal particle release associated with peri-implant bone destruction? An emerging concept. J Dent Res. 2018;97:259–65.
306. Kim KT, Eo MY, Nguyen TTH, Kim SM. General review of titanium toxicity. Int J Implant Dent. 2019;5:10.
307. Suárez-López del Amo F, Rudek, Wagner V, Martins M, O'Valle F, Galindo-Moreno P, et al. Titanium activates the DNA damage response pathway in oral epithelial cells: A pilot study. Int J Oral Maxillofac Implants. 2017;32:1413–20.
308. Suárez-López del Amo F, Garaicoa-Pazmiño C, Fretwurst T, Castilho RM, Squarize CH. Dental implants-associated release of titanium particles: A systematic review. Clin Oral Implants Res. 2018;29:1085–100.
309. Brunauer S, Emmett PH TE. Adsorption of gases in multimolecular layers. J Am Chem Soc. 1938;60:309–19.
310. ISO. 10993-12, Biological evaluation of medical devices. Part 12. Sample preparation and reference materials; ISO: Geneva, Switzerland, 2012.
311. Gutensohn K, Beythien C, Bau J, Fenner T, Grewe P, Koester R, et al. In vitro analyses of diamond-like carbon coated stents: Reduction of metal ion release, platelet activation, and thrombogenicity. Thromb Res. 2000;99:577–85.
312. Washburn EW. The dynamics of capillary flow. Phys Rev. 1921;17:273–83.

313. ISO. 10993-5, Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for in vitro cytotoxicity; ISO: Geneva, Switzerland, 2009.
314. Alrabiah M, Alrahlah A, Al-Hamdan RS, Al-Aali KA, Labban N, Abduljabbar T. Survival of adjacent-dental-implants in prediabetic and systemically healthy subjects at 5-years follow-up. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21:232–7.
315. Ratner, B.D. A perspective on titanium biocompatibility. In *titanium in medicine: Material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*; Brunette, DM, Tengvall, P, Textor, M, Thomsen, P, Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2001; pp. 1–12.
316. Velasco E, Monsalve-Guil L, Jimenez A, Ortiz I, Moreno-Muñoz J, Nuñez-Marquez E, Pegueroles M, et al. Importance of the roughness and residual stresses of dental implants on fatigue and osseointegration behavior. In vivo study in rabbits. *J Oral Implantol*. 2016;42:469–76.
317. Pérez RA, Gargallo J, Altuna P, Herrero-Climent M, Gil FJ. Fatigue of narrow dental implants: Influence of the hardening method. *Materials (Basel)*. 2020;13:1429.
318. ASTM-E3-11. Standard guide for preparation of metallographic specimens; ASTM international: West Conshohocken, PA, USA, 2017.
319. ASTM G5-14e1. Standard reference test method for making potentiostatic and potentiodynamic anodic polarization measurements; ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2014.
320. Mansfeld, F.; Kenkel, J.V. Laboratory studies of galvanic corrosion of aluminium alloys. In *galvanic and pitting corrosion-field and laboratory studies*; Baboian, R., France, W., Roew, L., Rynewicz, J., Eds.; ASTM: Philadelphia, PA, USA, 1976; pp. 20–47.
321. Canay S, Oktemer M. In vitro corrosion behavior of 13 prosthodontic alloys. *Quintessence Int*. 1992;23:279–87.

322. Senna P, Antoninha Del Bel Cury A, Kates S, Meirelles L. Surface damage on dental implants with release of loose particles after insertion into bone. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17:681–92.
323. Barbieri M, Mencia F, Papi P, Rosella D, Di Carlo S, Valente T, et al. Corrosion behavior of dental implants immersed into human saliva: Preliminary results of an in vitro study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21:3543–8.
324. Boyer, R.; Welsch, G.; Collings, W. *Materials properties handbook: Titanium alloys*; ASM International: Novelty, OH, USA, 1994.
325. Reclaru L, Meyer JM. Study of corrosion between a titanium implant and dental alloys. *J Dent*. 1994;22:159–68.
326. Gil FJ, Ginebra MP, Manero JM, Planell JA. Formation of α -Widmanstätten structure: Effects of grain size and cooling rate on the Widmanstätten morphologies and on the mechanical properties in Ti6Al4V alloy. *J Alloys Compd*. 2001;329:142–52.
327. Gil FJ, Manero JM, Ginebra MP, Planell JA. The effect of cooling rate on the cyclic deformation of β -annealed Ti–6Al–4V. *Mater Sci Eng A*. 2003;349:150–5.
328. Manero JM, Gil FJ, Planell JA. Deformation mechanisms of Ti–6Al–4V alloy with a martensitic microstructure subjected to oligocyclic fatigue. *Acta Mater*. 2000;48:3353–9.
329. Gil FJ, Planell JA, Padrós A, Aparicio C. The effect of shot blasting and heat treatment on the fatigue behavior of titanium for dental implant applications. *Dent Mater*. 2007;23:486–91.
330. Porter, D.A.; Easterling, K.E.; Sherif, M. *Phase transformation in metals and alloys*, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2013.
331. Aparicio C, Gil FJ, Fonseca C, Barbosa M, Planell JA. Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials*. 2003;24:263–73.
332. Delgado-Ruiz R, Romanos G. Potential causes of titanium particle and ion

- release in implant dentistry: A systematic review. *Int J Mol Sci.* 2018;19:3585.
333. Geis-Gerstorfer J. In vitro corrosion measurements of dental alloys. *J Dent.* 1994;22:247–51.
 334. Toledano-Serrabona J, Gil FJ, Camps-Font O, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ. Physicochemical and biological characterization of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: An in vitro study. Part I. Materials (Basel). 2021;14:6507.
 335. Toledano-Serrabona J, Sánchez-Garcés MÁ, Gay-Escoda C, Valmaseda-Castellón E, Camps-Font O, Verdeguer P, et al. Mechanical properties and corrosion behavior of Ti6Al4V particles obtained by implantoplasty: An in vitro study. Part II. Materials (Basel). 2021;14:6519.
 336. Díez-Tercero L, Delgado LM, Bosch-Rué E, Perez RA. Evaluation of the immunomodulatory effects of cobalt, copper and magnesium ions in a pro inflammatory environment. *Sci Rep.* 2021;11:11707.
 337. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8:e1000412.
 338. Sarmiento-González A, Encinar JR, Marchante-Gayón JM, Sanz-Medel A. Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear, as determined by double-focusing ICP-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2009;393:335–43.
 339. Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW joint working group on refinement. *Lab Anim.* 1993;27:1–22.
 340. Padial-Molina M, Rodriguez JC, Volk SL, Rios HF. Standardized in vivo model for studying novel regenerative approaches for multitissue bone-ligament interfaces. *Nat Protoc.* 2015;10:1038–49.

341. Liu G, Guo Y, Zhang L, Wang X, Liu R, Huang P, et al. A standardized rat burr hole defect model to study maxillofacial bone regeneration. *Acta Biomater.* 2019;86:450–64.
342. Taboada-López MV, Iglesias-López S, Herbello-Hermelo P, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis for isolating titanium dioxide nanoparticles from bivalve mollusk before SP-ICP-MS. *Anal Chim Acta.* 2018;1018:16–25.
343. Liu H, Zhu R, Liu C, Ma R, Wang L, Chen B, et al. Evaluation of decalcification techniques for rat femurs using HE and immunohistochemical staining. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9050754.
344. Taboada-López MV, Herbello-Hermelo P, Domínguez-González R, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. Enzymatic hydrolysis as a sample pre-treatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICP-MS. *Talanta.* 2019;195:23–32.
345. Nuevo-Ordoñez Y, Montes-Bayón M, Blanco González E, Sanz-Medel A. Titanium preferential binding sites in human serum transferrin at physiological concentrations. *Metallomics.* 2011;3:1297–303.
346. Cosmi M, Gonzalez-Quiñonez N, Tejerina Díaz P, Manteca Á, Blanco-González E, Bettmer J, et al. Evaluation of nanodebris produced by: In vitro degradation of titanium-based dental implants in the presence of bacteria using single particle and single cell inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2021;36:2007–16.
347. Schwarz F, John G, Mainusch S, Sahm N, Becker J. Combined surgical therapy of peri-implantitis evaluating two methods of surface debridement and decontamination. A two-year clinical follow up report. *J Clin Periodontol.* 2012;39:789–97.
348. Lozada JL, James RA, Boskovic M, Cordova C, Emanuelli S. Surgical repair of peri-implant defects. *J Oral Implantol.* 1990;16:42–6.

349. Schwarz F, Sahm N, Iglhaut G, Becker J. Impact of the method of surface debridement and decontamination on the clinical outcome following combined surgical therapy of peri-implantitis: A randomized controlled clinical study. *J Clin Periodontol*. 2011;38:276–84.
350. Quirynen M. The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: Results of in vitro and in vivo experiments. *J Dent*. 1994;22:S13-6.
351. Bollen CM, Papaioanno W, Van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res*. 1996;7:201–11.
352. Jorio IC, Stawarczyk B, Attin T, Schmidlin PR, Sahrman P. Reduced fracture load of dental implants after implantoplasty with different instrumentation sequences. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2021;32:881–92.
353. Gehrke SA, Aramburú Júnior JS, Dedavid BA, Shibli JA. Analysis of implant strength after implantoplasty in three implant-abutment connection designs: An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016;31:65–70.
354. Bertl K, Isidor F, von Steyern PV, Stavropoulos A. Does implantoplasty affect the failure strength of narrow and regular diameter implants? A laboratory study. *Clin Oral Investig*. 2021;25:2203–11.
355. Leitão-Almeida B, Camps-Font O, Correia A, Mir-Mari J, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E. Effect of bone loss on the fracture resistance of narrow dental implants after implantoplasty. An in vitro study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2021;26:e611–8.
356. Sharon E, Shapira L, Wilensky A, Abu-hatoum R, Smidt A. Efficiency and thermal changes during implantoplasty in relation to bur type. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013;15:292–6.

357. De Souza Júnior JM, Oliveira de Souza JG, Pereira Neto AL, Iaculli F, Piattelli A, Bianchini MA, et al. Analysis of effectiveness of different rotational instruments in implantoplasty: An in vitro study. *Implant Dent*. 2016;25:341–7.
358. Asa F, Thomsen P, Kunrath MF. The role of titanium particles and ions in the pathogenesis of peri-implantitis. *J Bone Metab*. 2022;29:145–54.
359. Callejas JA, Brizuela A, Ríos-Carrasco B, Gil J. The characterization of titanium particles released from bone-level titanium dental implants: Effect of the size of particles on the ion release and cytotoxicity behaviour. *Materials (Basel)*. 2022;15:3636.
360. Gemeinert M, Dörfel I, Griepentrog M, Gross U, Klaffke D, Knabe C, et al. Biological response to micron- and nanometer-sized particles known as potential wear products from artificial hip joints: Part I: Selection and characterization of model particles. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2009;89:379–89.
361. Callejas JA, Gil J, Brizuela A, Pérez RA, Bosch BM. Effect of the size of titanium particles released from dental implants on immunological response. *Int J Mol Sci*. 2022 30;23:7333.
362. Wu X, Cai C, Gil J, Jantz E, Al Sakka Y, Padial-Molina M, Suárez-López Del Amo F. Characteristics of particles and debris released after implantoplasty: A comparative study. *Materials (Basel)*. 2022;15:602.
363. Barrak FN, Li S, Muntane AM, Jones JR. Particle release from implantoplasty of dental implants and impact on cells. *Int J Implant Dent*. 2020;6:50.
364. Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P. Titanium oral implants: Surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface*. 2010;7:515–27.
365. Lozano P, Peña M, Herrero-Climent M, Rios-Santos JV, Rios-Carrasco B, Brizuela A, Gil J. Corrosion behavior of titanium dental implants with implantoplasty. *Materials (Basel)*. 2022;15:1563.
366. Hanawa T. Titanium-tissue interface reaction and its control with surface

treatment. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:170.

367. Hanawa T. Metal ion release from metal implants. *Mater Sci Eng C.* 2004;24:745–52.
368. Costa BC, Tokuhara CK, Rocha LA, Oliveira RC, Lisboa-Filho PN, Costa Pessoa J. Vanadium ionic species from degradation of Ti-6Al-4V metallic implants: In vitro cytotoxicity and speciation evaluation. *Mater Sci Eng C.* 2019;96:730–9.
369. Okazaki Y, Gotoh E. Metal ion effects on different types of cell line, metal ion incorporation into L929 and MC3T3-E1 cells, and activation of macrophage-like J774.1 cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33:1993–2001.
370. Willis J, Crean SJ, Barrak FN. Is titanium alloy Ti-6Al-4 V cytotoxic to gingival fibroblasts — A systematic review. *Clin Exp Dent Res.* 2021;7:1033–44.
371. Schwarz F, John G, Becker J. The influence of implantoplasty on the diameter, chemical surface composition, and biocompatibility of titanium implants. *Clin Oral Investig.* 2017;21:2355–61.
372. Beheshti Maal M, Aanerød Ellingsen S, Reseland JE, Verket A. Experimental implantoplasty outcomes correlate with fibroblast growth in vitro. *BMC Oral Health.* 2020;20:25.
373. Schwarz F, Langer M, Hagen T, Hartig B, Sader R, Becker J. Cytotoxicity and proinflammatory effects of titanium and zirconia particles. *Int J Implant Dent.* 2019;5:4–9.
374. Toma S, Lasserre J, Brex MC, Nyssen-Behets C. In vitro evaluation of peri-implantitis treatment modalities on Saos-2osteoblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27:1085–92.
375. Aparicio C, Gil FJ, Fonseca C, Barbosa M, Planell JA. Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials.* 2003;24:263–73.
376. Revathi A, Borrás AD, Muñoz AI, Richard C, Manivasagam G. Degradation

- mechanisms and future challenges of titanium and its alloys for dental implant applications in oral environment. *Mater Sci Eng C*. 2017;76:1354–68.
377. Fleck C, Eifler D. Corrosion, fatigue and corrosion fatigue behaviour of metal implant materials, especially titanium alloys. *Int J Fatigue*. 2010;32:929–35.
 378. Mese H, Matsuo R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. *J Oral Rehabil*. 2007;34:711–23.
 379. Barão VAR, Mathew MT, Assunção WG, Yuan JC-C, Wimmer MA, Sukotjo C. Stability of cp-Ti and Ti-6Al-4V alloy for dental implants as a function of saliva pH: An electrochemical study. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23:1055–62.
 380. Nikolopoulou F. Saliva and dental implants. *Implant Dent*. 2006;15:372–6.
 381. Prestat M, Thierry D. Corrosion of titanium under simulated inflammation conditions: Clinical context and in vitro investigations. *Acta Biomater*. 2021;136:72–87.
 382. Ivanovski S, Bartold PM, Huang YS. The role of foreign body response in peri-implantitis: What is the evidence? *Periodontol 2000*. 2022; Epub ahead of print.
 383. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Tannenbaum R, Boyan BD, Schwartz Z. Electrical implications of corrosion for osseointegration of titanium implants. *J Dent Res*. 2011;90:1389–97.
 384. Cortada M, Giner L, Costa S, Gil FJ, Rodríguez D, Planell JA. Metallic ion release in artificial saliva of titanium oral implants coupled with different metal superstructures. *Biomed Mater Eng*. 1997;7:213–20.
 385. Padrós R, Giner-Tarrida L, Herrero-Climent M, Punset M, Gil FJ. Corrosion resistance and ion release of dental prosthesis of CoCr obtained by CAD-CAM milling, casting and laser sintering. *Metals (Basel)*. 2020;10:827.
 386. Sridhar S, Wilson TG, Palmer KL, Valderrama P, Mathew MT, Prasad S, et al. In vitro investigation of the effect of oral bacteria in the surface oxidation of dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17:562–75.
 387. Alrabeah GO, Knowles JC, Petridis H. Reduction of tribocorrosion products when

using the platform-switching concept. *J Dent Res*. 2018;97:995–1002.

388. Kotsakis GA, Black R, Kum J, Berbel L, Sadr A, Karoussis I, et al. Effect of implant cleaning on titanium particle dissolution and cytocompatibility. *J Periodontol*. 2021;92:580–91.
389. Lombardo DJ, Siljander MP, Gehrke CK, Moore DD, Karadsheh MS, Baker EA. Fretting and corrosion damage of retrieved dual-mobility total hip arthroplasty systems. *J Arthroplasty*. 2019;34:1273–8.
390. Ciszewski A, Baraniak M, Urbanek-Brychczyńska M. Corrosion by galvanic coupling between amalgam and different chromium-based alloys. *Dent Mater*. 2007;23:1256–61.
391. Pettersson M, Kelk P, Belibasakis GN, Bylund D, Molin Thorén M, Johansson A. Titanium ions form particles that activate and execute interleukin-1 β release from lipopolysaccharide-primed macrophages. *J Periodontal Res*. 2017;52:21–32.
392. Safioti LM, Kotsakis GA, Pozhitkov AE, Chung WO, Daubert DM. Increased levels of dissolved titanium are associated with peri-implantitis – A cross-sectional study. *J Periodontol*. 2017;88:436–42.
393. Barrak F, Li S, Muntane A, Bhatia M, Crossthwaite K, Jones J. Particle release from dental implants immediately after placement - An ex vivo comparison of different implant systems. *Dent Mater*. 2022;38:1004–14.
394. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: Toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov*. 2020;6:36.
395. Amengual-Peñafiel L, Córdova LA, Constanza Jara-Sepúlveda M, Brañes-Aroca M, Marchesani-Carrasco F, Cartes-Velásquez R. Osteoimmunology drives dental implant osseointegration: A new paradigm for implant dentistry. *Jpn Dent Sci Rev*. 2021;57:12–9.
396. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: Impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:4–9.

397. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140:805–20.
398. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6:291.
399. Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front Immunol*. 2018;9:2379.
400. Sun Y, Shu R, Li CL, Zhang MZ. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2010;81:1488–96.
401. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*. 2010;89:1349–63.
402. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023.
403. Li Y, Ling J, Jiang Q. Inflammasomes in alveolar bone loss. *Front Immunol*. 2021;12:691013.
404. Uehara A, Takada H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2007;86:249–54.
405. Uehara A, Takada H. Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells. *J Dent Res*. 2008;87:682–6.
406. Yu X, Hu Y, Freire M, Yu P, Kawai T, Han X. Role of toll-like receptor 2 in inflammation and alveolar bone loss in experimental peri-implantitis versus periodontitis. *J Periodontol Res*. 2018;53:98–106.
407. Koutouzis T, Catania D, Neiva K, Wallet SM. Innate immune receptor expression in peri-implant tissues of patients with different susceptibility to periodontal diseases. *J Periodontol*. 2013;84:221–9.
408. Fink SL, Cookson BT. Pillars article: Caspase-1-dependent pore formation during

pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol.* 2006;8:1812–25.

409. Wu R, Wang N, Comish PB, Tang D, Kang R. Inflammasome-dependent coagulation activation in sepsis. *Front Immunol.* 2021;12:641750.
410. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol.* 2016;16:407–20.
411. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519–50.
412. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. alternatively activated macrophages. *Front Immunol.* 2019;10:1084.
413. Garlet GP, Giannobile W V. Macrophages: The bridge between inflammation resolution and tissue repair? *J Dent Res.* 2018;97:1079–81.
414. Dutzan N, Konkel JE, Greenwell-Wild T, Moutsopoulos NM. Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunol.* 2016;9:1163–72.
415. Fretwurst T, Garaicoa-Pazmino C, Nelson K, Giannobile WV, Squarize CH, Larsson L, et al. Characterization of macrophages infiltrating peri-implantitis lesions. *Clin Oral Implants Res.* 2020;31:274–81.
416. Han X, Lin X, Seliger AR, Eastcott J, Kawai T, Taubman MA. Expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand by B cells in response to oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:190–6.
417. Yamaguchi M, Ukai T, Kaneko T, Yoshinaga M, Yokoyama M, Ozaki Y, et al. T cells are able to promote lipopolysaccharide-induced bone resorption in mice in the absence of B cells. *J Periodontal Res.* 2008;43:549–55.
418. Dodo CG, Meirelles L, Aviles-Reyes A, Ruiz KGS, Abranches J, Cury AADB. Pro-inflammatory analysis of macrophages in contact with titanium particles and

porphyromonas gingivalis. Braz Dent J. 2017;28:428–34.

419. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. Int Immunopharmacol. 2014;23:37–45.
420. Bosshart H, Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. Ann Transl Med. 2016;4:4–7.
421. Zwolak I. Vanadium carcinogenic, immunotoxic and neurotoxic effects: A review of in vitro studies. Toxicol Mech Methods. 2014;24:1–12.
422. Challa VS, Mali S, Misra RD. Reduced toxicity and superior cellular response of preosteoblasts to Ti-6Al-7Nb alloy and comparison with Ti-6Al-4V. J Biomed Mater Res A. 2013;101:2083–9.
423. Ryu AH, Eckalbar WL, Kreimer A, Yosef N, Ahituv N. Use antibiotics in cell culture with caution: Genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. Sci Rep. 2017;7:7533.
424. Smith RP, Eckalbar WL, Morrissey KM, Luizon MR, Hoffmann TJ, Sun X, et al. Genome-wide discovery of drug-dependent human liver regulatory elements. PLoS Genet. 2014;10:e1004648.
425. Llobet L, Montoya J, López-Gallardo E, Ruiz-Pesini E. Side Effects of culture media antibiotics on cell differentiation. Tissue Eng Part C Methods. 2015;21:1143–7.
426. Koussounadis A, Langdon SP, Um IH, Harrison DJ, Smith VA. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. Sci Rep. 2015;5:10775.
427. Holt G, Murnaghan C, Reilly J, Meek RM. The biology of aseptic osteolysis. Clin Orthop Relat Res. 2007;460:240–52.
428. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. Blood. 1991;77:1627–52.
429. Wachi T, Shuto T, Shinohara Y, Matono Y, Makihiro S. Release of titanium ions from an implant surface and their effect on cytokine production related to alveolar

bone resorption. *Toxicology*. 2015;327:1–9.

430. Caicedo MS, Desai R, McAllister K, Reddy A, Jacobs JJ, Hallab NJ. Soluble and particulate Co-Cr-Mo alloy implant metals activate the inflammasome danger signaling pathway in human macrophages: A novel mechanism for implant debris reactivity. *J Orthop Res*. 2009;27:847–54.
431. Kwiecień I, Polubiec-Kownacka M, Dziedzic D, Wołosz D, Rzepecki P, Domagała-Kulawik J. CD163 and CCR7 as markers for macrophage polarization in lung cancer microenvironment. *Cent Eur J Immunol*. 2019;44:395–402.
432. Wang X, Li Y, Feng Y, Cheng H, Li D. Macrophage polarization in aseptic bone resorption around dental implants induced by Ti particles in a murine model. *J Periodontal Res*. 2019;54:329–38.
433. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012;36:705–16.
434. Kandaswamy E, Sakulpapong W, Guo X, Ni A, Powell H, Tatakis D, et al. Titanium as a possible modifier of inflammation around dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2022;37:381–90.
435. Yoshimura A, Mori H, Ohishi M, Aki D, Hanada T. Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:704–8.
436. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T. Cytokines differentially regulate CXCL10 production by interferon-gamma-stimulated or tumor necrosis factor-alpha-stimulated human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2009;44:225–31.
437. Cirera A, Sevilla P, Manzanares MC, Franch J, Galindo-Moreno P, Gil J. Osseointegration around dental implants biofunctionalized with TGFβ-1 inhibitor peptides: An in vivo study in beagle dogs. *J Mater Sci Mater Med*. 2020;31:62.
438. Kazuo T, Suzuki Y, Yoshimura K, Yasui H, Karayama M, Hozumi H, et al. Macrophage mannose receptor CD206 predicts prognosis in community-acquired

pneumonia. *Sci Rep.* 2019;9:18750.

439. Wollenberg A, Mommaas M, Oppel T, Schottdorf EM, Günther S, Moderer M. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol.* 2002;118:327–34.
440. Pajarinen J, Kouri VP, Jämsen E, Li TF, Mandelin J, Kontinen YT. The response of macrophages to titanium particles is determined by macrophage polarization. *Acta Biomater.* 2013;9:9229–40.
441. Obando-Pereda GA, Fischer L, Stach-Machado DR. Titanium and zirconia particle-induced pro-inflammatory gene expression in cultured macrophages and osteolysis, inflammatory hyperalgesia and edema in vivo. *Life Sci.* 2014;97:96–106.
442. Gu Q, Shi Q, Yang H. The role of TLR and chemokine in wear particle-induced aseptic loosening. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:596870.
443. Purdue PE, Koulouvaris P, Potter HG, Nestor BJ, Sculco TP. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;454:251–61.
444. Bitar D, Parvizi J. Biological response to prosthetic debris. *World J Orthop.* 2015;6:172–89.
445. Samelko L, Landgraeber S, Mcallister K, Jacobs J, Hallab NJ. Cobalt alloy implant debris induces inflammation and bone loss primarily through danger signaling, not TLR4 activation: Implications for DAMP-ening implant related inflammation. *PLoS One.* 2016;11:e0160141.
446. Athanasou NA. The pathobiology and pathology of aseptic implant failure. *Bone Jt Res.* 2016;5:162–8.
447. Yao JJ, Lewallen EA, Trousdale WH, Xu W, Thaler R, Salib CG, et al. Local cellular responses to titanium dioxide from orthopedic implants. *Biores Open Access.* 2017;6:94–103.
448. Haleem-Smith H, Argintar E, Bush C, Hampton D, Postma WF, Chen FH, et al.

Biological responses of human mesenchymal stem cells to titanium wear debris particles. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2012;30:853–63.

449. Okafor CC, Haleem-Smith H, Laqueriere P, Manner PA, Tuan RS. Particulate endocytosis mediates biological responses of human mesenchymal stem cells to titanium wear debris. *J Orthop Res.* 2006;24:461–73.
450. Galarraga-Vinueza ME, Obreja K, Ramanauskaite A, Magini R, Begic A, Sader R, et al. Macrophage polarization in peri-implantitis lesions. *Clin Oral Investig.* 2021;25:2335–44.
451. Eger M, Sterer N, Liron T, Kohavi D, Gabet Y. Scaling of titanium implants entrains inflammation-induced osteolysis. *Sci Rep.* 2017;7:39612.
452. Choo MK, Yeo H, Zayzafoon M. NFATc1 mediates HDAC-dependent transcriptional repression of osteocalcin expression during osteoblast differentiation. *Bone.* 2009;45:579–89.
453. Lamour V, Detry C, Sanchez C, Henrotin Y, Castronovo V, Bellahcène A. Runx2- and histone deacetylase 3-mediated repression is relieved in differentiating human osteoblast cells to allow high bone sialoprotein expression. *J Biol Chem.* 2007;282:36240–9.
454. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, et al. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med.* 2005;11:880–5.
455. Hayashi M, Nimura K, Kashiwagi K, Harada T, Takaoka K, Kato H, et al. Comparative roles of Twist-1 and Id1 in transcriptional regulation by BMP signaling. *J Cell Sci.* 2007;120:1350–7.
456. Wang ML, Tuli R, Manner PA, Sharkey PF, Hall DJ, Tuan RS. Direct and indirect induction of apoptosis in human mesenchymal stem cells in response to titanium particles. *J Orthop Res.* 2003;2:697–707.
457. Meng B, Chen J, Guo D, Ye Q, Liang X. The effect of titanium particles on rat

- bone marrow stem cells in vitro. *Toxicol Mech Methods*. 2009;19:552–8.
458. Gromolak S, Krawczenko A, Antończyk A, Buczak K, Kielbowicz Z, Klimczak A. Biological characteristics and osteogenic differentiation of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells stimulated with FGF-2 and BMP-2. *Int J Mol Sci*. 2020;21:9726.
 459. Loebel C, Czekanska EM, Bruderer M, Salzmann G, Alini M, Stoddart MJ. In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. *Tissue Eng - Part A*. 2015;21:115–23.
 460. Schliephake H, Sicilia A, Nawas B Al, Donos N, Gruber R, Jepsen S, et al. Drugs and diseases: Summary and consensus statements of group 1. The 5th EAO consensus conference 2018. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29:93–9.
 461. Mombelli A, Hashim D, Cionca N. What is the impact of titanium particles and biocorrosion on implant survival and complications? A critical review. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29:37–53.
 462. Suárez-López del Amo F, Garaicoa-Pazmiño C, Fretwurst T, Castilho RM, Squarize CH. Dental implants-associated release of titanium particles: A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29:1085–100.
 463. Dumbleton JH, Manley MT. Metal-on-metal total hip replacement: What does the literature say? *J Arthroplasty*. 2005;20:174–88.
 464. Romanini E, Lupporelli S. "Metal-on-metal total hip replacement. What does the literature say?". *J Arthroplasty*. 2005;20:821.
 465. Catelas I, Wimmer MA. New insights into wear and biological effects of metal-on-metal bearings. *J Bone Jt Surg*. 2011;93:76–83.
 466. Bracco P, Bellare A, Bistolfi A, Affatato S. Ultra-high molecular weight polyethylene: Influence of the chemical, physical and mechanical properties on the wear behavior. A review. *Materials (Basel)*. 2017;10:791.
 467. Schwarz EM, Looney RJ, O'Keefe RJ. Anti-TNF- α therapy as a clinical intervention for periprosthetic osteolysis. *Arthritis Res*. 2000;2:165–8.

468. Marshall A, Ries MD, Paprosky W. How prevalent are implant wear and osteolysis, and how has the scope of osteolysis changed since 2000? *J Am Acad Orthop Surg*. 2008;16:S1–6.
469. Harris WH. Wear and periprosthetic osteolysis: The problem. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;393:66–70.
470. Lohmann CH, Singh G, Willert HG, Buchhorn GH. Metallic debris from metal-on-metal total hip arthroplasty regulates periprosthetic tissues. *World J Orthop*. 2014;5:660–6.
471. Doorn PF, Campbell PA, Worrall J, Benya PD, McKellop HA, Amstutz HC. Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: Transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. *J Biomed Mater Res*. 1998;42:103–11.
472. Messous R, Henriques B, Bousbaa H, Silva FS, Teughels W, Souza JCMM. Cytotoxic effects of submicron- and nano-scale titanium debris released from dental implants: An integrative review. *Clin Oral Investig*. 2021;25:1627–40.
473. Vivegananthan B, Shah R, Karuppiiah AS, Karuppiiah S V. Metallosis in a total knee arthroplasty. *BMJ Case Rep*. 2014;2:2013–5.
474. Gogna P, Paladini P, Merolla G, Augusti CA, Maddalena DF, Porcellini G. Metallosis in shoulder arthroplasty: An integrative review of literature. *Musculoskelet Surg*. 2016;100:3–11.
475. Postler A, Lützner C, Beyer F, Tille E, Lützner J. Analysis of total knee arthroplasty revision causes. *BMC Musculoskelet Disord*. 2018;19:55.
476. Kheder W, Al Kawas S, Khalaf K, Samsudin AR. Impact of tribocorrosion and titanium particles release on dental implant complications — A narrative review. *Jpn Dent Sci Rev*. 2021;57:182–9.
477. Fage SW, Muris J, Jakobsen SS, Thyssen JP. Titanium: A review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. *Contact*

- Dermatitis. 2016;74:323–45.
478. Shakeel M, Jabeen F, Shabbir S, Asghar MS, Khan MS, Chaudhry AS. Toxicity of nano-titanium dioxide (TiO₂-NP) through various routes of exposure: A review. *Biol Trace Elem Res*. 2016;172:1–36.
 479. He X, Hartlieb E, Rothmund L, Waschke J, Wu X, Van Landuyt KL, et al. Intracellular uptake and toxicity of three different titanium particles. *Dent Mater*. 2015;31:734–44.
 480. Schwarz F, Sahm N, Mihatovic I, Golubovic V, Becker J. Surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects: Cone-beam computed tomographic and histological analysis. *J Clin Periodontol*. 2011;38:939–49.
 481. Rakic M, Radunovic M, Petkovic-Curcin A, Tatic Z, Basta-Jovanovic G, Sanz M. Study on the immunopathological effect of titanium particles in peri-implantitis granulation tissue: A case-control study. *Clin Oral Implants Res*. 2022;33:656–66.
 482. Cipriano CA, Issack PS, Beksac B, Della Valle AG, Sculco TP, Salvati EA. Metallosis after metal-on-polyethylene total hip arthroplasty. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2008;37:18–25.
 483. Pisanu F, Andreozzi M, Fiori E, Altamore F, Bartoli M, Caggiari G, et al. Surgical management of hip prosthetic failure in metallosis: A case series and literature review. *J Orthop*. 2021;28:10–20.
 484. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:110–20.
 485. Clohisy JC, Frazier E, Hirayama T, Abu-Amer Y. RANKL is an essential cytokine mediator of polymethylmethacrylate particle-induced osteoclastogenesis. *J Orthop Res*. 2003;21:202–12.
 486. Dalal A, Pawar V, McAllister K, Weaver C, Hallab NJ. Orthopedic implant cobalt-alloy particles produce greater toxicity and inflammatory cytokines than titanium alloy and zirconium alloy-based particles in vitro, in human osteoblasts, fibroblasts, and macrophages. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100:2147–58.

487. Domenech J, Hernández A, Rubio L, Marcos R, Cortés C. Interactions of polystyrene nanoplastics with in vitro models of the human intestinal barrier. *Arch Toxicol*. 2020;94:2997–3012.
488. García-Rodríguez A, Kazantseva L, Vila L, Rubio L, Velázquez A, Ramírez MJ, et al. Micronuclei detection by flow cytometry as a high-throughput approach for the genotoxicity testing of nanomaterials. *Nanomaterials (Basel)*. 2019;9:1677.
489. Sahan I, Anagnostakos K. Metallosis after knee replacement: A review. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2020;140:1791–808.
490. Olmedo DG, Nalli G, Verdú S, Paparella ML, Cabrini RL. Exfoliative cytology and titanium dental implants: A pilot study. *J Periodontol*. 2013;84:78–83.
491. Wilson TG. Bone loss around implants– Is it metallosis? *J Periodontol*. 2021;92:181–5.
492. Albrektsson T, Becker W, Coli P, Jemt T, Mölne J, Sennerby L. Bone loss around oral and orthopedic implants: An immunologically based condition. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21:786–95.
493. Noronha Oliveira M, Schunemann WVH, Mathew MT, Henriques B, Magini RS, Teughels W, et al. Can degradation products released from dental implants affect peri-implant tissues? *J Periodontal Res*. 2018;53:1–11.
494. Becker ST, Beck-Broichsitter BE, Graetz C, Dörfer CE, Wiltfang J, Häsler R. Peri-Implantitis versus periodontitis: Functional differences indicated by transcriptome profiling. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014;16:401–11.
495. Souza JGS, Costa Oliveira BE, Bertolini M, Lima CV, Retamal-Valdes B, de Faveri M, et al. Titanium particles and ions favor dysbiosis in oral biofilms. *J Periodontal Res*. 2020;55:258–66.
496. Daubert D, Pozhitkov A, McLean J, Kotsakis G. Titanium as a modifier of the peri-implant microbiome structure. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018;20:945–53.
497. Soto-Alvaredo J, Blanco E, Bettmer J, Hevia D, Sainz RM, López Cháves C, et

- al. Evaluation of the biological effect of Ti generated debris from metal implants: Ions and nanoparticles. *Metallomics*. 2014;6:1702–8.
498. Javed F, Al-Hezaimi K, Almas K, Romanos GE. Is titanium sensitivity associated with allergic reactions in patients with dental implants? A systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013;15:47–52.
 499. Fretwurst T, Buzanich G, Nahles S, Woelber JP, Riesemeier H, Nelson K. Metal elements in tissue with dental peri-implantitis: A pilot study. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27:1178–86.
 500. Tinoco AD, Saxena M, Sharma S, Noinaj N, Delgado Y, González EPQ, et al. Unusual synergism of transferrin and citrate in the regulation of Ti(IV) speciation, transport, and toxicity. *J Am Chem Soc*. 2016;138:5659–65.
 501. Olmedo DG, Tasat D, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Titanium transport through the blood stream. An experimental study on rats. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14:1099–103.
 502. Domingo MG, Kurtz M, Maglione G, Martin M, Brites F, Tasat DR, et al. Systemic effect of TiO₂ micro- and nanoparticles after acute exposure in a murine model. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2022;110:1563–72.
 503. Kasai Y, Iida R, Uchida A. Metal concentrations in the serum and hair of patients with titanium alloy spinal implants. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28:1320–6.
 504. Jacobs JJ, Skipor AK, Patterson LM, Hallab NJ, Paprosky WG, Black J, et al. Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty. A prospective, controlled, longitudinal study. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80:1447–58.
 505. Jacobs JJ, Silverton C, Hallab NJ, Skipor AK, Patterson L, Black J, et al. Metal release and excretion from cementless titanium alloy total knee replacements. *Clin Orthop Relat Res*. 1999;358:173–80.
 506. Mercuri LG, Miloro M, Skipor AK, Bijukumar D, Sukotjo C, Mathew MT. Serum metal levels in maxillofacial reconstructive surgery patients: A pilot study. *J Oral*

Maxillofac Surg. 2018;76:2074–80.

507. Kovoichich M, Finley BL, Novick R, Monnot AD, Donovan E, Unice KM, et al. Understanding outcomes and toxicological aspects of second generation metal-on-metal hip implants: A state-of-the-art review. *Crit Rev Toxicol*. 2018;48:853–901.
508. Kwon YM, Lombardi AV, Jacobs JJ, Fehring TK, Lewis CG, Cabanela ME. Risk stratification algorithm for management of patients with metal-on-metal hip arthroplasty: Consensus statement of the American Association of Hip and Knee Surgeons, the American Academy of Orthopaedic Surgeons, and the Hip Society. *J Bone Joint Surg Am*. 2014;96:e4.
509. Swiatkowska I, Martin N, Hart AJ. Blood titanium level as a biomarker of orthopaedic implant wear. *J Trace Elem Med Biol*. 2019;53:120–8.
510. Shumakova AA, Shipelin VA, Trusov NV, Gmoshinski IV. Content of essential and toxic trace elements in organs of obese Wistar and Zucker leprfa rats receiving quercetin. *J Trace Elem Med Biol*. 2021;64:126687.
511. Smith PG, Rodrigues LC, Fine PE. Assessment of the protective efficacy of vaccines against common diseases using case-control and cohort studies. *Int J Epidemiol*. 1984;13:87–93.
512. Treviño S, Díaz A, Sánchez-Lara E, Sanchez-Gaytan BL, Perez-Aguilar JM, González-Vergara E. Vanadium in biological action: Chemical, pharmacological aspects, and metabolic implications in diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res*. 2019;188:68–98.
513. Frisken KW, Dandie GW, Lugowski S, Jordan G. A study of titanium release into body organs following the insertion of single threaded screw implants into the mandibles of sheep. *Aust Dent J*. 2002;47:214–7.
514. Deppe H, Greim H, Brill T, Wagenpfeil S. Titanium deposition after peri-implant care with the carbon dioxide laser. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17:707–

14.

515. Schliephake H, Reiss G, Urban R, Neukam FW, Guckel S. Metal release from titanium fixtures during placement in the mandible: An experimental study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993;8:502–11.
516. Wennerberg A, Ide-Ektessabi A, Hatkamata S, Sawase T, Johansson C, Albrektsson T, et al. Titanium release from implants prepared with different surface roughness: An in vitro and in vivo study. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15:505–12.
517. Geraets L, Oomen AG, Krystek P, Jacobsen NR, Wallin H, Laurentie M, et al. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. *Part Fibre Toxicol*. 2014;11:30.
518. Sarmiento-González A, Marchante-Gayón JM, Tejerina-Lobo JM, Paz-Jiménez J, Sanz-Medel A. High-resolution ICP-MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni, and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391:2583–9.
519. Mjöberg B, Hellquist E, Mallmin H, Lindh U. Aluminum, Alzheimer's disease and bone fragility. *Acta Orthop Scand*. 1997;68:511–4.
520. Costa BC, Tokuhara CK, Rocha LA, Oliveira RC, Lisboa-Filho PN, Costa Pessoa J. Vanadium ionic species from degradation of Ti-6Al-4V metallic implants: In vitro cytotoxicity and speciation evaluation. *Mater Sci Eng C*. 2019;96:730–9.
521. Liao H, Wurtz T, Li J. Influence of titanium ion on mineral formation and properties of osteoid nodules in rat calvaria cultures. *J Biomed Mater Res*. 1999;47:220–7.
522. Meng B, Yang X, Chen Y, Zhai J, Liang X. Effect of titanium particles on osteoclast activity in vitro. *Mol Med Rep*. 2010;3:1065–9.
523. Hoet PHM, Brüske-Hohlfeld I, Salata O V. Nanoparticles – Known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology*. 2004;2:1–15.
524. Bruno ME, Tasat DR, Ramos E, Paparella ML, Evelson P, Rebagliati RJ, et al.

- Impact through time of different sized titanium dioxide particles on biochemical and histopathological parameters. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2014;102:1439–48.
525. Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J Appl Toxicol*. 2009;29:330–7.
526. Guglielmotti MB, Domingo MG, Steimetz T, Ramos E, Paparella ML, Olmedo DG. Migration of titanium dioxide microparticles and nanoparticles through the body and deposition in the gingiva: An experimental study in rats. *Eur J Oral Sci*. 2015;123:242–8.
527. L'Azou B, Jorly J, On D, Sellier E, Moisan F, Fleury-Feith J, et al. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Part Fibre Toxicol*. 2008;5:1–14.
528. Gil FJ, Rodriguez A, Espinar E, Llamas JM, Padullés E, Juárez A. Effect of oral bacteria on the mechanical behavior of titanium dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012;27:64–8.
529. Candás-Zapico S, Kutscher DJ, Montes-Bayón M, Bettmer J. Single particle analysis of TiO₂ in candy products using triple quadrupole ICP-MS. *Talanta*. 2018;180:309–15.

