

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología



TESIS DOCTORAL

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON PLASMA DE ARGÓN SOBRE
TITANIO GRADO IV Y V EN EL COMPORTAMIENTO CELULAR
OSTEOBLÁSTICO

CAROLINA GONZÁLEZ BLANCO

SEVILLA, 2022

“Nada en este mundo debe ser temido... solo entendido.

Ahora es el momento de comprender más,

para que podamos temer menos.”

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Me he propuesto numerosos objetivos a lo largo de mi vida, afortunadamente he tenido grandes fuentes de inspiración:

A mi tutor y profesor, Daniel Torres Lagares, siempre has sido motivo de admiración, trabajo y esfuerzo para mí. Me has ayudado incondicionalmente como docente y me has acompañado como amigo en este dulce y a veces amargo camino. Gracias por seguir inspirando siempre.

A mi director, José Luis Gutiérrez Pérez, por transmitir valores más allá de la ciencia, por la humildad a pesar de ser uno de los más grandes, de las pocas personas en el mundo que podría estar horas escuchando y nunca me saciaría. Fuente de inspiración inagotable.

A mi madre, a la que le debo todo lo que soy, no podría haber tenido mejor referente en el mundo, de los casi ocho mil millones de personas que existen, para transmitirme los mejores valores de perseverancia y sacrificio que tú. Te admiro y quiero a partes iguales.

A mi incondicional padre, por entregarme tu amor, apoyarme y respetarme como nadie, nada sería sin tus valores al honor y la palabra que me has transmitido y enseñado desde y para siempre.

A mi hermano Marco Antonio, por el apoyo y sacrificio que has tenido que hacer a lo largo de la vida para ayudarme a conseguir mis metas, nunca lo olvidaré, eternamente agradecida; a mi hermana política María, por entregarme tu cariño desde el primer día, respetarme, compartir alegrías, trasmitirme tu capacidad de esfuerzo, nada nos parará.

A mis amigas con las que comparto la pasión por la odontología Patricia, Carla, Aída. Gracias por ser fuente de inspiración para mí, por acompañarme en el disfrute de la vida de la forma que más me gusta, a vuestro lado.

A mis amigos Inma D., Maria T., Valme, Laura C., Laura T., Victor, Pastora, Nieves, Dani, Edu, Nacho, Javi, Lauri, M^a J., Laura M., Sandra, Cristina; gracias por aportar momentos incommensurables a lo largo de mi vida, no sería la misma sin este trocito que tengo de cada uno de vosotros.



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología

C/ Avicena s/n 41009

Sevilla

Dr. GUTIÉRREZ PÉREZ, JOSÉ LUIS, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático Vinculado de Cirugía Bucal de la Universidad de Sevilla.

Dr. TORRES LAGARES, DANIEL. Doctor en Odontología y Catedrático de Cirugía Bucal de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Influencia del Tratamiento con Plasma de Argón sobre Titanio Grado IV y V en el Comportamiento Celular Osteoblástico”. Desarrollado por D^a Carolina González Blanco, ha sido realizado bajo nuestra dirección, habiendo revisado el mismo y autorizando su presentación como Tesis Doctoral para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe.

En Sevilla, y para que así conste y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado a 25 de junio de 2022.

Fdo: Dr. José Luis Gutiérrez Pérez

Fdo: Dr. Daniel Torres Lagares

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURA

Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

ADN: *ácido desoxirribonucleico*

AFM: *microscopía de fuerza atómica*

Ag: *plata*

Ar: *argón*

ARB: *accumulative role bonding*

ARC: *fusión por arco*

ARN: *ácido ribonucleico*

ASTM: *Sociedad Estadounidense de Pruebas y Materiales*

BIC: *unión implante hueso*

BMG: *vidrios metálicos a granel*

CaP: *iones de calcio y fósforo*

CAP: *plasma atmosférico frío*

CpTi: *titanio comercialmente puro*

CVD: *deposición de vapor químico*

ColTi: *titanio recubierto de colágeno*

DAE: *doble grabado ácido (double acid etching)*

DLF: *formación directa con láser*

EDC: *unión covalente obtenida por carbodiimida*

EIS: *espectroscopía de impedancia electroquímica*

GPa: *gigapascal (valores del módulo de young)*

GR4NT: *titanio grado IV con tratamiento de ráfaga de arena grande con grabado ácido y sin tratamiento con plasma de argón*

GR4TR: *titanio grado IV con tratamiento de ráfaga de arena grande con grabado ácido y plasma de argón*

GR5NT: *titanio grado V con tratamiento de ráfaga de arena grande con grabado ácido y sin tratamiento con plasma de argón*

GR5TR: *titanio grado V con tratamiento de ráfaga de arena grande con grabado ácido y plasma de argón*

HA: *hidroxiapatita*

HMC: *células mesenquimales humanas*

HOB: *osteoblastos primarios humanos*

LBL: *autoensamblaje capa por capa*

LENS: *conformación de redes por ingeniería láser*

MAO: *oxidación por microarco*

MEC: *matriz extracelular*

MG-63: *línea celular humana hipotriploide (conteniendo menos de tres veces el número de cromosomas de una célula diploide humana normal)*

MMA: *metacrilato de metilo*

μm: *micrómetro*

NTP: *plasma no térmico*

Pa: *pascal*

PLC: *programmable logic controller*

PM: *pulvimetalurgia*

PMMA: *polimetilmetacrilato*

Ra: *rugosidad superficial*

SBF: *biofluidos acelulares simulados*

SEBM: *fusión selectiva por haz de electrones*

SEM: *microscopio electrónico de barrido*

SIM: *martensita inducida por estrés*

SLA: *sandblasted large grit acidetched*

SLM: *fusión selectiva por láser*

SMA: *aleación con memoria de forma*

Sp: *especie o especie de*

Spp: *especies*

Ta: *tantalio*

Ti: *titanio*

TRITC: *tetramethylrhodamine*

DAPI: *4', 6 - diamidino - 2 - fenilindol*

UV: *radiación ultravioleta*

UVC: *luz ultravioleta de onda corta*

Xo: *xantina oxidasa*

XPS: *espectroscopía fotoelectrónica de rayos X*

ÍNDICE**ABSTRACT, 14****RESUMEN, 16****1. INTRODUCCIÓN, 18**

1.1. Biocompatibilidad y titanio, 19

1.2. Fallas en los implantes de titanio – corrosión, 27

1.2.1. Complicaciones mecánicas, 28

1.2.2. Complicaciones biológicas, 28

1.3. Nuevas aleaciones de titanio, 29

1.3.1. Superficies de titanio porosas, 30

1.3.2. Técnicas de fabricación de implantes porosos de Cp-Ti, 34

1.3.3. Aleaciones de Ti de fase β , 35

1.4. Osteoblastos – célula MG63, 39

1.5. Osteointegración, 41

1.6. Fases de tratamiento de superficies y cicatrización del titanio, 45

1.6.1. Modificación física, 45

1.6.2. Modificación electroquímica, 53

1.6.3. Tratamiento químico, 59

1.6.4. Modificación de la actividad biológica, 69

1.7. Plasma de argón, 78

2. HIPÓTEIS DE TRABAJO, 88**3. OBJETIVOS, 90**

4. MATERIAL Y MÉTODOS, 92

4.1. Justificación de la elección de la célula MG-63 como modelo experimental, 93

4.2. Preparación de la muestra, 93

4.3. Desinfección de discos, 96

4.4. Cultivo de células, 96

4.5. Análisis de viabilidad celular, 99

4.6. Análisis morfológico y balance energético mitocondrial, 100

4.7. Análisis estadístico, 105

5. RESULTADOS, 107

5.1. Viabilidad celular, 108

5.2. Análisis morfológico de las células, 112

5.3. Análisis del balance energético mitocondrial, 116

6. DISCUSIÓN, 120**7. CONCLUSIONES, 148****8. BIBLIOGRAFÍA, 150****9. ANEXO, 169**

ABSTRACT

Influence of argon plasma treatment on grade IV and V titanium on osteoblastic cell behavior.

Background. Titanium is characterized by its biocompatibility and resistance to stress and fatigue. Treatment with argon plasma may promote the growth of human osteoblasts with respect to cell adhesion and proliferation. The aim of this study was to analyze the behavior of human osteoblasts (MG-63) on Grade IV and V titanium possessing a sand-blasted, acid-etched (SLA) surface. SLA is a widely used surface treatment to create micro and macro retentions to enhance osteoconductive properties on the surface.

Material and Methods. A group of titanium grade IV not treated with argon plasma, a group of titanium grade V not treated with argon plasma, a group of titanium IV treated with argon plasma and a group of titanium grade V treated with argon plasma were decontaminated. and compared each other. In each dish, 20×10^4 cells were cultured for morphological analysis, study of cell viability and mitochondrial energy balance (with respect to a negative control (0%) and a positive control, with 100% viability).

Results. At 24 h titanium treated with SLA showed a higher percentage of cell viability ($47.3 \pm 8.1\%$) compared to titanium IV treated with argon plasma, which presented a percentage of $79.1 \pm 1.1\%$. Grade V titanium treated with argon plasma presented a higher viability percentage $91.3 \pm 3.0\%$ whereas nontreated Grade V titanium presented $53.3 \pm 4.0\%$. Cells cultivated on the surfaces with an argon-plasma treatment were enlarged in comparison to non-treated discs. The cells with smaller circularity with a greater spread and spindle shape were the ones cultivated on the Grade V titanium surface. Cells seeded

on treated titanium IV and titanium V, treated or not, showed higher mitochondrial activity over nontreated titanium IV.

Conclusions. Cells cultivated on those Grade V titanium discs that were decontaminated with argon plasma presented higher levels of cell adhesion and proliferation, lower mitochondrial damage and a higher mean cell area compared to those not decontaminated with argon plasma.

Keywords: dental implants; osteoblasts/drug effects; argon/therapeutic use; titanium; surface decontamination

RESUMEN***Influencia del tratamiento con plasma de argón sobre titanio grado IV y V en el comportamiento celular osteoblástico.***

Antecedentes. El titanio se caracteriza por su biocompatibilidad resistencia al estrés y la fatiga. El tratamiento con plasma de argón puede favorecer el crecimiento de osteoblastos humanos con respecto a la adhesión y proliferación celular. El objetivo de este estudio fue analizar el comportamiento de los osteoblastos humanos (MG-63) sobre titanio de Grado IV y V que posee una superficie pulida con chorro de arena y grabada con ácido (SLA). SLA es un tratamiento de superficie ampliamente utilizado para crear micro y macro retenciones para mejorar las propiedades osteoconductoras en la superficie de los implantes dentales.

Material y Métodos. Se descontaminó un grupo de titanio grado IV no tratado con plasma de argón, un grupo de titanio grado V no tratado con plasma de argón, un grupo de titanio IV tratado con plasma de argón y un grupo de titanio grado V tratado con plasma de argón y se compararon entre ellos. En cada disco se cultivaron 20×10^4 células para análisis morfológico, estudio de la viabilidad celular y balance energético mitocondrial (con respecto a un control negativo (0%) y un control positivo, con viabilidad del 100%).

Resultados. A las 24 h el titanio tratado con SLA mostró un mayor porcentaje de viabilidad celular ($47,3 \pm 8,1\%$) en comparación con el titanio IV tratado con SLA y con plasma de argón, que presentó un porcentaje de $79,1 \pm 1,1\%$. El titanio de grado V tratado con argón plasma y SLA presentó un porcentaje de viabilidad mayor $91,3 \pm 3,0\%$ mientras que el titanio de grado V sin tratamiento de plasma de argón presentó un porcentaje de viabilidad del $53,3 \pm 4,0\%$. Las células cultivadas en las superficies con un

tratamiento SLA y con plasma de argón se agrandaron en comparación con los discos no tratados con plasma de argón. Las células con menor circularidad con mayor extensión y forma de huso fueron las cultivadas en la superficie de titanio de Grado V. Las células sembradas en titanio IV tratado con plasma de argón y titanio V, tratado o no con plasma de argón, mostraron una mayor actividad mitocondrial que el titanio IV no tratado con plasma de argón.

Conclusiones. Las células cultivadas en discos de titanio de grado V tratados con SLA y que se descontaminados con plasma de argón presentaron niveles más altos de adhesión y proliferación celular, menor daño mitocondrial y un área celular media más alta en comparación con aquellas no descontaminadas con plasma de argón.

Palabras clave: Implantes dentales; Osteoblastos / Efectos de fármacos; Argón / Uso terapéutico; Titanio; Descontaminación superficial.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los biomateriales juegan un papel muy importante en la actualidad. En las últimas décadas con los avances en la Medicina y el procesamiento de materiales, se ha desarrollado una gran cantidad de biomateriales con propiedades adecuadas para diversas aplicaciones. Los biomateriales se utilizan principalmente en ortopedia, cuidado dental, administración de fármacos, ingeniería de tejidos de la piel y dispositivos cardiovasculares. Antes de reconocer cualquier material como un implante, es imperativo saber que dicho material no está causando ningún efecto dañino, es decir, debe ser biocompatible para el cuerpo humano (1). Williams definió la biocompatibilidad como “la capacidad de un material para realizar su función deseada con respecto a una terapia médica, sin provocar ningún efecto local o sistémico indeseable en el receptor o beneficiario de esa terapia, pero generando la respuesta celular o tisular beneficiosa más apropiada a esa situación específica y optimizando el rendimiento clínicamente relevante de esa terapia” (2).

1.1. Biocompatibilidad y titanio

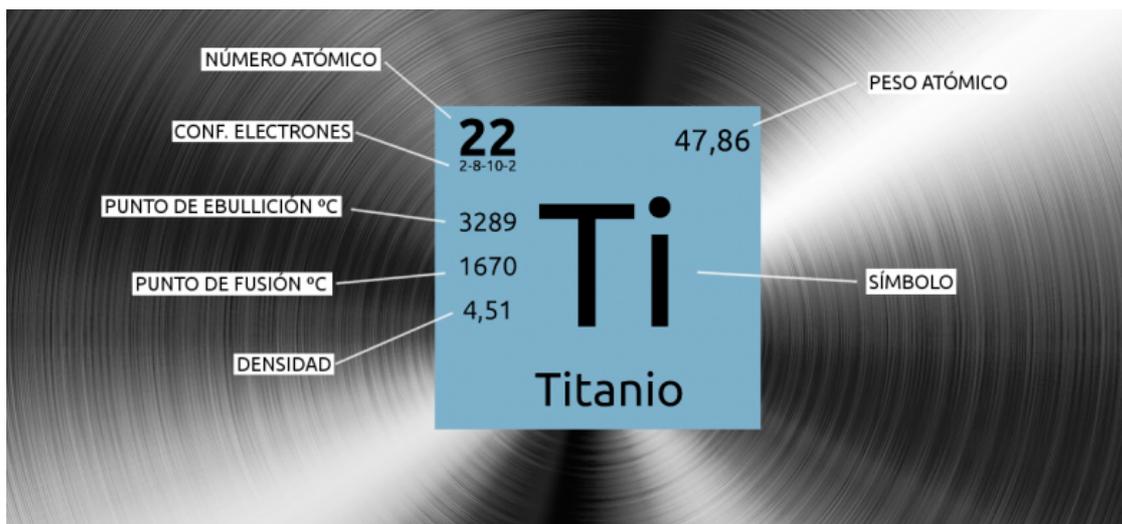


Figura 1. Características atómicas del elemento Ti.

El titanio fue descubierto en 1791 por un mineralogista aficionado llamado William Gregor, en arena de hierro magnético (ilmenita). Este elemento también fue identificado en 1795 por el químico alemán Martin Heinrich Klaproth, quien lo denominó “titanio” en honor a los titanes de la mitología griega, los poderosos hijos de la Tierra. El titanio puro es uno de los metales más abundantes en la corteza terrestre y la litosfera, pero no pudo aislarse en grandes cantidades hasta la invención del proceso Kroll por un metalúrgico llamado William Kroll, en 1946 (3). Los avances posteriores a la Segunda Guerra Mundial permitieron aplicaciones de titanio en dispositivos médicos, quirúrgicos y dentales.

Hoy en día, el titanio comercialmente puro (Cp-Ti) y sus aleaciones se utilizan ampliamente para la fabricación de implantes ortopédicos y dentales debido a sus propiedades mecánicas y físicas superiores, como resistencia a la corrosión y alto módulo de elasticidad en tensión, y su excelente biocompatibilidad (4). Atendiendo a la pureza del titanio y de sus aleaciones, el titanio se clasifica en grados. El Titanio Comercialmente Puro (Cp-Ti) abarca los grados de 1 a 4 y contienen cantidades de Titanio superiores al 98%. Estos grados también se denominan grados sin aleación o grados de titanio puro. Los grados del Titanio aleado abarca los grados 5 y superiores.

Los grados de Titanio puro ascienden a medida que aumenta la concentración de oxígeno. Además de oxígeno, el titanio Cp-Ti también contiene pequeños porcentajes de nitrógeno, hidrógeno, hierro y carbono. En la siguiente tabla podemos ver cómo al aumentar la concentración de Oxígeno se obtienen mejoras sustanciales en la tensión de rotura.

Tabla 1. Componentes y porcentaje de Titanio Grado IV y Grado V.

GRADO DE TITANIO	HIERRO (FE)	OXÍGENO (O)	HIDRÓGENO (H)	CARBONO (C)	NITRÓGENO (N)	TENSIÓN DE ROTURA
GRADO 4	0,3%	0,4%	0,015%	0,08%	0,05%	550MPa
GRADO DE TITANIO	TITANIO (Ti)	ALUMINIO (Al)	VANADIO (V)	TENSIÓN DE ROTURA		
GRADO 5	90%	6%	4%	954MPa		

Es bien sabido que una de las principales razones de las excelentes propiedades físicas y biológicas del titanio y sus aleaciones es la película de óxido nativo (TiO_2) que se crea espontáneamente en su superficie tras la exposición al aire (5). Esta película, que tiene solo unos pocos nanómetros de espesor ($4,3 \pm 0,2$ nm para la superficie cp-Ti pulida mecánicamente) (6), parece ser responsable de la estabilidad química, la inercia química, la resistencia a la corrosión e incluso la biocompatibilidad del titanio (5).

Sin duda, se ha avanzado mucho a lo largo de los años y las tasas de supervivencia de los implantes dentales y ortopédicos son bastante satisfactorias. Específicamente, para los implantes dentales, las tasas de supervivencia oscilan entre el 90% y el 96,5% (7-10).

Los implantes de titanio y aleaciones de titanio se han utilizado ampliamente en las clínicas. Según la Sociedad Estadounidense de Pruebas y Materiales (ASTM), existen cuatro grados de titanio comercialmente puro (CpTi) que se utilizan en el biomaterial de implantes. Los grados I-IV de CpTi tienen diferentes grados de pureza, con diferentes cantidades de elementos intersticiales (carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno y hierro). El grado V se refiere a las aleaciones de titanio Ti-6Al-4V, que es la aleación más

utilizada. Además, en la actualidad, se utilizan diversos nanómetros para el tratamiento de superficies de implantes dentales a base de titanio.

Entre esos materiales de recubrimiento, dos materiales de recubrimiento que contienen titanio (Ti y TiN (nitruro de titanio)), se han estudiado y recomendado para mejorar la resistencia química y el desgaste de los implantes de titanio (11). Aunque el titanio y sus aleaciones se consideran el material de implante más biocompatible debido a su noble característica bioquímica, el desgaste y la corrosión todavía ocurren especialmente en un ambiente extremo como el oral. La partícula liberada puede provenir de la capa de recubrimiento de titanio o del propio implante de titanio. Ambos fenómenos se han estudiado e informado en muchos artículos y han informado por separado.

Maritini y cols. compararon la implantación de tornillos de titanio recubiertos por pulverización de plasma en polvo de titanio (TPS-Ti) y tornillos de titanio recubiertos de fluorohidroxiapatita (FHA-Ti). Los autores informaron la evidencia de dispersión de titanio dentro de los espacios medulares cuando se implantó TPS-Ti, que fue el resultado de la fricción que se produjo en la superficie del implante-interfaz del hueso huésped, lo que provocó la pérdida de integración en la capa de recubrimiento y la liberación de partículas de metal al tejido circundante (12).

Está bien establecido que el dióxido de titanio se forma y cubre la superficie del implante, lo que lo hace altamente resistente a la corrosión. Sin embargo, en estudios recientes, se encontraron partículas de implantes en los tejidos periimplantarios, lo que puede sugerir fuertemente que se ha producido un proceso corrosivo en el implante de titanio. También se estudió el efecto de diferentes factores ambientales sobre los implantes dentales. Hay informes de que la corrosión es significativa en condiciones de

un pH bajo o una alta concentración de fluoruro (13-16). En un estudio in vitro de Strietzel y cols. (13), se detectó la influencia de la presencia de flúor en la corrosión del titanio. La corrosión aumenta aún más a un pH más bajo y menos influenciada por los ácidos orgánicos y sus valores de pH. Schiff y cols. (15) probaron los efectos del flúor y el pH en el titanio y las aleaciones de titanio y descubrieron que los iones de flúor podían destruir y corroer el titanio y la capa de pasivación de titanio.

Las aleaciones de titanio que se utilizaron fueron Ni-Ti, Ni-Ti-Co y TiAl6V4. Además, en un estudio reciente, Penarrieto-Juanito y cols. evaluaron las liberaciones de iones de los sistemas de implantes dentales en fluoruro y peróxido de hidrógeno y examinaron los cambios superficiales en este proceso. Las imágenes del microscopio electrónico de barrido (SEM) indicaron la oxidación excesiva en las superficies de la articulación implante-pilar junto con la liberación de iones Ti, Al y V después de sumergirse en gel de fluoruro de sodio al 1,23%, mientras que no se observó corrosión significativa en un ambiente de peróxido de hidrógeno (16).

Recientemente, hay más estudios que trabajan sobre la vinculación de los implantes de titanio y las complicaciones o fallas de los implantes. Wachi y cols. informaron que los iones Ti pueden estar implicados en los efectos de deterioro de la mucositis periimplantaria, que puede convertirse en periimplantitis acompañada de resorción ósea alveolar (17). Olmedo y cols. comunicaron dos casos de lesiones reactivas de mucosa periimplantaria asociadas a implantes dentales de titanio, un caso fue diagnosticado como granuloma piógeno y el otro caso como granuloma periférico de células gigantes. La presencia de partículas metálicas en los tejidos sugiere que la etiología de las lesiones podría estar relacionada con el proceso de corrosión de la

estructura metálica. En un estudio anterior, los autores encontraron macrófagos cargados con partículas de titanio como indicadores del proceso de corrosión en el tejido periimplantario blando de implantes dentales humanos fallidos (18).

Suponiendo que las partículas desprendidas del implante pueden ser un iniciador de la periimplantitis, se han realizado muchos estudios para abordar la respuesta del tejido de la mucosa oral al implante de titanio, así como a los tornillos de cubierta del implante. Para determinar la correlación entre partículas de titanio y periimplantitis, Olmedo y cols. realizaron la prueba citológica exfoliativa y observaron partículas dentro y fuera de las células epiteliales y macrófagos. Además, el experimento señaló que la concentración de partículas del implante en el grupo de periimplantitis fue significativamente mayor que en el grupo de control (19). El reciente estudio de Penmetsa y cols, en el que también se utilizó la citología exfoliativa para detectar la partícula de titanio en un grupo que tiene gingivitis leve y otro grupo que tiene una condición moderada a grave, también tiene un resultado similar. El sesenta por ciento de las muestras del grupo de moderadas a graves presentaban partículas de titanio en la citología periimplantaria (20).

En el estudio de Wilson y cols., se analizaron 34 de un total de 36 biopsias de periimplantitis humanas (21). Las imágenes del SEM revelaron la partícula de titanio predominante rodeada de células inflamatorias. El estudio menciona tres posibilidades que pueden provocar la presencia de partículas de titanio en el tejido circundante. Son el desprendimiento debido a la fricción entre el implante y la superficie ósea durante la instalación, el desgaste durante el desbridamiento en las visitas de mantenimiento y la corrosión (21).

Fretwurst y cols. Informaron de la presencia de partículas de metal en el tejido blando periimplantario junto con los macrófagos M1 y el aumento de la concentración de titanio con la detección de linfocitos (22). En asociación con la liberación de partículas metálicas, también se determinó el daño de la superficie del implante durante el procedimiento de inserción (23).

Por otro lado, un estudio de Addison y cols. Sobre el uso de espectroscopia de microenfoque de rayos X de sincrotrón para detectar trazas de distribución de Ti en el tejido demostró una distribución dispersa y heterogénea de Ti en tejidos inflamados extraídos alrededor de los implantes de Ti que penetran en la piel. Las características de ubicación y distribución de las partículas de Ti sugirieron que es poco probable que los residuos de la colocación de implantes sean los principales contribuyentes. Los autores propusieron que la aparición de Ti en tejidos estudiados puede derivar del micro-movimiento y la corrosión localizada en las grietas de la superficie (24).

Una de las causas del fracaso del implante se puede atribuir a las reacciones alérgicas al titanio. Ha habido informes de reacciones de hipersensibilidad como eritema, urticaria, eccema, hinchazón, dolor, necrosis y pérdida ósea debido a los implantes dentales de titanio (25, 26, 27). A pesar de la limitación de la evidencia proporcionada por casos clínicos aislados, estos no pueden pasarse por alto. En varios informes de casos en los que se sospechó inicialmente una alergia al titanio, tras más investigaciones, los agentes alérgicos fueron otros metales (28). La confiabilidad de la prueba de parche para el titanio actual no está garantizada para uso clínico. Por tanto, parece que son necesarios futuros estudios y contramedidas (29).

Un caso de alergias después de la instalación de implantes dentales de titanio fue registrado por Hosoki y cols. (30) a un hombre de 69 años. El paciente tuvo una implantación dental exitosa en 2008. Una reacción alérgica de eccema ocurrió en 2010 después de insertar un tornillo de titanio debido a una fractura de pierna. El tornillo de titanio se retiró un año después; sin embargo, el eccema solo se redujo en un 50%. Se retiraron todas las prótesis metálicas, excepto el implante dental y el pilar, y la reacción del eccema se redujo al 30%; los síntomas aún permanecían. La extracción del implante y el pilar del implante de titanio en 2014 condujo a una recuperación completa. En Corea, también se han notificado casos de alergia después de la inserción de implantes de titanio (25). En 2012, una mujer de 70 años presentó una estomatitis que parecía ser una reacción alérgica. No hubo evidencia de hipersensibilidad al metal en este paciente. No hubo problemas con la colocación del implante; sin embargo, después de que se levantó el pilar y se hizo la prótesis, el paciente se quejó de dolor. La extracción de la prótesis confirmó el eritema en la encía alrededor de la prótesis retirada. Se sospechó que los síntomas alérgicos se debían a los pilares recubiertos de TiN y los síntomas mejoraron después del uso de pilares de titanio. Una prueba de parche mostró un resultado positivo para TiN.

También se han informado reacciones alérgicas a materiales de titanio con prótesis ortopédicas. Thomas y cols. (31) informaron síntomas de eccema y formación ósea inadecuada en el caso de un paciente masculino de 35 años con un implante de titanio insertado tras la fractura de la mano. En este caso, la prueba del parche mostró una reacción negativa al titanio, níquel, cromo, cobalto, etc. Sin embargo, la prueba de transformación de linfocitos mostró un patrón aumentado para el titanio. Además, en 1991, Lalor y cols. también notificaron reacciones de hipersensibilidad al titanio y notificaron la proliferación de células inflamatorias en pacientes con prótesis ortopédicas

fallidas (32). Aunque se ha evaluado que la biocompatibilidad del titanio es buena porque provoca una reacción menos hipersensible que otros metales, no significa que no existan síntomas de alergia relacionados con el titanio. Informes anteriores han demostrado que las reacciones de hipersensibilidad al titanio y las aleaciones de titanio pueden provocar fallos en el tratamiento clínico. Por lo tanto, los síntomas de alergia al titanio o los componentes de aleación de titanio también deben tenerse en cuenta como un factor relacionado con las fallas de los implantes dentales.

Aunque se cree que el uso de titanio es seguro con una alta tasa de éxito, en algunos casos, hay informes raros de problemas causados por el titanio.

Los problemas que pueden surgir en los implantes dentales a base de titanio incluyen la generación de partículas e iones de titanio y aleación de titanio depositados en los tejidos circundantes debido a la corrosión y el desgaste de los implantes, lo que da como resultado la pérdida ósea debido a reacciones inflamatorias, que pueden conducir a una falla de osteointegración del implante dental. Estos iones y partículas de titanio se depositan sistémicamente y pueden provocar reacciones tóxicas en otros tejidos. Además, pueden producirse fallos del implante y reacciones alérgicas debido a reacciones de hipersensibilidad. Los implantes de zirconio pueden considerarse una alternativa en estos casos.

1.2. Fallas en los implantes de titanio - corrosión

Las razones de las fallas en todos los estudios anteriores son infección, fracturas del implante, desgaste de las superficies articuladas y aflojamiento del implante que pueden atribuirse al efecto de protección contra el estrés, inflamación séptica o aséptica,

fatiga del material y actividad excesiva del paciente y desprendimiento en la interfaz tejido-implante. A pesar de los resultados satisfactorios, es necesario mejorar.

La corrosión es un fenómeno estrechamente relacionado con los fallos de los implantes (33). El procedimiento comienza después de la implantación in vivo de un material en el cuerpo humano y su contacto con los fluidos corporales extracelulares (34). El cuerpo humano es un entorno hostil que contiene agua, compuestos orgánicos complejos, proteínas, aminoácidos, linfa, saliva, plasma y una variedad de iones, como sodio, cloruro, bicarbonato, oxígeno, potasio, calcio, magnesio y cloruro. Tras la implantación, la corrosión es inducida por interacciones electroquímicas entre el material del implante y los compuestos químicos mencionados (34). Como resultado, ocurren picaduras, rozamiento, corrosión galvánica y corrosión bajo tensión, mientras que las siguientes complicaciones pueden ser tanto mecánicas como biológicas.

1.2.1. Complicaciones mecánicas

Las complicaciones mecánicas incluyen principalmente la fractura por fatiga y son aceleradas por la corrosión (33-34). Más específicamente, en lo que respecta a los implantes dentales, el porcentaje de fracturas del material se informa entre el 0,2% y el 1,5%, en intervalos de seguimiento de hasta 15 años (36-38).

1.2.2. Complicaciones biológicas

Las complicaciones biológicas relacionadas con la corrosión son causadas por la liberación de iones metálicos e incluyen toxicidad, carcinogenicidad e hipersensibilidad (34). La biocorrosión (degradación química y electroquímica), la tribocorrosión (pérdida de material debido a procesos mecánicos, químicos y electroquímicos) y su combinación dan como resultado la liberación de partículas metálicas del material del implante a los

tejidos periimplantarios y otros órganos del cuerpo (38-41). Este fenómeno es más intenso cuando están presentes biopelículas o altas concentraciones de fluoruro, una situación común en el ambiente oral (42). Específicamente, la presencia de iones metálicos activa macrófagos, neutrófilos y linfocitos T y provoca una mayor producción de citocinas y proteasas metálicas (43, 44). Además, en el caso del Ti-6Al-4V, las partículas de aluminio y vanadio han sido caracterizadas como tóxicas y mutagénicas, respectivamente, y han sido acusadas de producir osteomalacia, enfermedad de Alzheimer y trastornos neurológicos (45-49).

El efecto de protección contra el estrés es otro fenómeno relacionado con el fracaso del implante (50). En el caso de los implantes ortopédicos, el hueso no está bien cargado, debido a la rigidez del implante y, en consecuencia, el implante se afloja progresivamente, debido a la atrofia ósea (50, 51). Parece que esta situación se inhibe o al menos se desacelera con el uso de aleaciones de implantes más elásticas (52). En particular, el valor del módulo de Young para el hueso oscila entre $6,9 \pm 4,3$ GPa y $25,0 \pm 4,3$ GPa (53), mientras que el mismo valor para cp-Ti y Ti-6Al-4V es 103-107 GPa y 114-120 GPa, respectivamente (54). El módulo de elasticidad indica la rigidez de un material, cuanto más rígido, mayor es su módulo de elasticidad. Se puede suponer que existe la necesidad de utilizar aleaciones de Ti más elásticas como materiales de implantes.

1.3. Nuevas aleaciones de titanio

Debido a múltiples factores, existe la necesidad de crear nuevas aleaciones de Ti y tratamientos superficiales que presenten las siguientes características:

- Alta resistencia a la corrosión, menor módulo de elasticidad, alta resistencia mecánica y resistencia al desgaste para evitar fallas mecánicas.
- Mejor biocompatibilidad, sin reacciones alérgicas, citotoxicidad y carcinogenicidad, para evitar fallas biológicas.
- Superficies más bioactivas que conducirán a una osteointegración más rápida y mejorada.
- Aumento de las propiedades antimicrobianas que reducirán los fallos debidos a infecciones.

1.3.1. Superficies de Ti porosas

Entre las nuevas aleaciones de titanio encontramos las superficies de titanio porosas, que parecen inducir el crecimiento óseo (55). Sobre la base de ese concepto, se han introducido implantes de Ti con diferentes porosidades (56). Se pueden detectar dos tipos de poros mediante la observación en el SEM en una superficie porosa de implante de Ti: (a) macroporos ($> 100 \mu\text{m}$) que se crean mediante el uso de soportes espaciales y (b) pequeños microporos ($\sim 10 \mu\text{m}$) que pueden observarse en las paredes de los macroporos y surgir durante el proceso de sinterización (57). Sin embargo, el tamaño de poro óptimo que facilita la colonización celular aún permanece sin respuesta y los hallazgos de diferentes estudios son ambiguos y contradictorios. Xue y cols. realizaron ensayos MTT (es un reactivo que simplifica el recuento celular), de muestras de cp-Ti porosas (27% de porosidad, tamaño de poros entre 100 y 800 μm) frente a muestras no porosas en líneas celulares precursoras osteoblásticas 1 clonadas (OPC1), derivadas de tejido óseo fetal humano (57). El número de células fue significativamente mayor en las superficies porosas de Ti después de 3 días ($p < 0,01$) y 10 días ($p < 0,05$), mientras que

después de 21 días las superficies porosas tenían aún más células, pero no hubo diferencia estadísticamente significativa en comparación con las superficies no porosas. Los mismos autores demostraron que las células no pueden crecer en poros de menos de $100\ \mu\text{m}$, mientras que los puentes celulares se formaron entre las elongaciones de las células adyacentes en poros que tienen un tamaño de $150\ \mu\text{m}$. En poros de más de $200\ \mu\text{m}$, las células crecieron en el centro de los poros sin formar puentes celulares. Además, Hollander y cols. probaron in vitro el rendimiento de muestras porosas de Ti-6Al-4V fabricadas mediante formación directa con láser (DLF) en cultivos de osteoblastos primarios humanos (HOB) (58). Después de 14 días, la tinción de vivo / muerto mostró un crecimiento excesivo completo de células en poros de $500\ \mu\text{m}$ de tamaño. Por el contrario, los poros con tamaños de $700\ \mu\text{m}$ y $1000\ \mu\text{m}$ no crecieron completamente en exceso, sino que dieron lugar a patrones de crecimiento circular.

La interconectividad entre los poros también se ha probado como un factor que afecta el crecimiento óseo hacia el interior de los implantes porosos (59). Otsuki y cols. evaluaron el crecimiento óseo tridimensional en cuatro muestras de Ti poroso sinterizado utilizando micro-TC (microtomografía computarizada) (59). Se utilizó hidrógeno de amonio como soporte de espacio. Las muestras (50% de porosidad, tamaño de poros de 250 a $500\ \mu\text{m}$) se implantaron en cóndilos femorales de conejos durante 6 semanas. Los autores concluyeron que los poros más estrechos de $52\ \mu\text{m}$ no permitían el crecimiento óseo. Sin embargo, destacaron que diferentes aleaciones de Ti con diferentes tratamientos superficiales pueden demostrar diferentes valores de umbral.

Se ha intentado describir la relación entre la densidad y la estructura de los materiales porosos y sus propiedades mecánicas (60-62).

Sin embargo, en los modelos teóricos no se tienen en cuenta factores críticos como el tipo de fases, el tamaño de grano y la microestructura (63). Por lo tanto, se desprecian las características de concentración de esfuerzos y deformación (64, 65). Por el contrario, los modelos de elementos finitos se utilizan de forma más fiable para la simulación del comportamiento mecánico de los implantes porosos (60, 66). Más específicamente, Niu y cols. desarrollaron un modelo a dos escalas que describe el comportamiento mecánico de los materiales porosos y toma en consideración tanto la estructura macro como la microporosa (67).

Como se mencionó anteriormente, la porosidad afecta las propiedades mecánicas de los implantes porosos (63). Según Jha y cols., el módulo de Young disminuye linealmente cuando la densidad disminuye (68). En consecuencia, es posible fabricar implantes de Ti con un módulo elástico comparable al del hueso cortical humano (6,9-25,0 GPa) (53). Xue y cols. fabricaron implantes porosos con un 27% de porosidad y un tamaño de poro que osciló entre 100 y 800 μm , utilizando el método de modelado de red diseñado por láser (LENS) (57). Encontraron valores de módulo elástico y resistencia mecánica que oscilaron entre 2.6–44 GPa y 24–463 MPa, respectivamente. Además, Chen y cols. fabricaron muestras de cp-Ti con dos porosidades diferentes (64% y 76%) utilizando polvo de cp-Ti y H_2O_2 como reactivo espumante (69). Los valores de resistencia a la compresión y módulo de elasticidad para las dos porosidades diferentes se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de porosidad.

POROSIDAD	64%	76%
MÓDULO DE YOUNG	3.3 ± 0.8 GPa	2.1 ± 0.5 GPa
FUERZA COMPRESIVA	102 ± 10 MPa	23 ± 0.5 MPa

De manera similar, en otro estudio, se investigó el módulo de elasticidad de una aleación con memoria de forma (SMA) (70). Se fabricaron muestras de NiTi poroso en forma de varilla con diferentes porosidades mediante la técnica de pulvimetalurgia. A medida que la porosidad aumentó del 35,5% al 42,1%, el módulo de Young disminuyó de 8 GPa a 6 GPa (70).

El tamaño de los poros también se ha investigado como un factor que influye en las propiedades mecánicas (71-73). Tuncer y col. realizaron pruebas de compresión en Cp-Ti con diferentes porosidades entre 35% y 75% y tamaño de poros entre 150 μm y 1700 μm (72). Encontraron que tanto el módulo elástico como la resistencia a la compresión aumentaron de 3.8 GPa a 6.1 GPa y de 43 MPa a 87 MPa, respectivamente, cuando el tamaño de los macroporos se incrementó de 150 μm a 1700 μm (72). Además, la aleatorización de los poros (uniforme o de diferentes tamaños, orientación y forma de los poros) puede aumentar las concentraciones de tensión en un nivel microestructural y provocar una deformación plástica localizada temprana (74).

Las concentraciones de estrés dentro de los poros de los implantes de Ti pueden reducirse mediante la silanización (2,0% de 3-metacriloxipropiltrimetoxisilano) de las

paredes de los poros y el posterior llenado de los poros con polimetilmetacrilato (PMMA). Este procedimiento da como resultado una mayor resistencia a la tracción (50-250 MPa, dependiendo de la porosidad y el tamaño de los poros) debido a la adhesión del PMMA a las paredes de los poros de titanio, lo que conduce a concentraciones de tensión reducidas. Por lo tanto, es posible fabricar implantes de Ti porosos con una mejor resistencia a la tracción, manteniendo el módulo elástico en los mismos niveles bajos (15-60 GPa, dependiendo de la porosidad y el tamaño de los poros). El PMMA presenta un módulo de elasticidad significativamente menor (2-4 GPa) que el titanio. Finalmente, el módulo de Young del complejo PMMA-Ti permanece bajo, a pesar del aumento de la resistencia a la tracción (75). Sin embargo, todavía existen preocupaciones sobre la toxicidad del monómero de metacrilato de metilo (MMA) residual que permanece después de la polimerización (76). Se puede concluir que los materiales porosos tienen grandes ventajas, como un bajo módulo de elasticidad y propiedades osteoconductoras, pero también existen algunas desventajas. Es necesario avanzar mucho para mejorar sus propiedades mecánicas, de modo que se conviertan en biomateriales adecuados para implantes ortopédicos y dentales que soporten cargas.

1.3.2. Técnicas de fabricación de implantes porosos de Cp-Ti

Se han propuesto diferentes métodos para fabricar implantes porosos de Cp-Ti o aleación de Ti. El método de fabricación afecta directamente la porosidad, el tamaño de los poros, la orientación y la geometría, la presencia de impurezas y la contaminación del biomaterial. Algunas de las técnicas de fabricación son las siguientes:

- Polvo de sinterización suelto (77).

-
- Método de soporte de espacio (56).
 - Sinterización por plasma de chispa o técnica de consolidación asistida por campo.
 - Sinterización por microondas.
 - Moldeo por inyección de metales.
 - Prensado isostático en caliente sin cápsulas.
 - Técnica de formación de espuma isotérmica en estado sólido.
 - Colada por congelación y colada por congelación inversa.
 - Síntesis de combustión.
 - Fundición de deslizamiento.
 - Fundición en gel.
 - Lechada espumante.
 - Materiales de alambre metálico enredados.
 - Técnicas de creación rápida de prototipos: fusión selectiva por láser (SLM) fusión selectiva por haz de electrones (SEBM) y conformación de redes por ingeniería láser (LENS) (78).

1.3.3. Aleaciones de Ti de Fase β

El titanio es un elemento alotrópico, lo que significa que existe en más de una forma cristalográfica.

A temperatura ambiente, la estructura cristalina del titanio es hexagonal empaquetada (α -fase), mientras que, a 888 ° C, esta estructura se transforma en cúbica centrada en el cuerpo (β -fase). La temperatura de transformación (beta transus) se define como la temperatura de equilibrio más baja a la que el material es 100% beta y depende en gran medida de (5):

- Los elementos intersticiales oxígeno, nitrógeno y carbono (estabilizadores alfa) que elevan la temperatura del titanio.
- Hidrógeno (estabilizador beta), que reduce la temperatura de transformación.
- Impurezas metálicas o elementos de aleación que pueden aumentar o disminuir la temperatura de transformación.

Los elementos de aleación pueden clasificarse generalmente como estabilizadores alfa o beta. Los estabilizadores alfa, por ejemplo, aluminio, oxígeno y nitrógeno, favorecen la fase alfa del Ti dentro de la aleación al aumentar la temperatura de transformación. Los estabilizadores beta, como vanadio, tantalio, niobio, molibdeno, níquel, cromo, cobre y hierro, dan como resultado la estabilidad de la fase beta a temperaturas más bajas. El hafnio y el circonio son únicos porque son isomorfos con las fases alfa y beta. Por lo tanto, es común clasificar las aleaciones de Ti en tres categorías, refiriéndose a las fases que predominan dentro de la aleación (5):

- Alfa.
- Alfa Beta.
- Beta.

En los biomateriales de titanio que se utilizan actualmente, la estructura cristalográfica del titanio es la fase alfa (cp-Ti) o la fase alfa-beta (Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4Nb) (54).

El porcentaje p / v (peso del soluto y el volumen de la solución) del estabilizador beta en la aleación de Ti es crucial para obtener la estructura cristalográfica (5). En un estudio, se probó la relación estructura-propiedad de las aleaciones de Ti-Nb fundidas. Los autores, después de usar difracción de rayos X, concluyeron que las aleaciones que contienen 15% p / v o menos de niobio están dominadas por fases alfa hexagonales, mientras que en las aleaciones con 27,5% p / v de niobio, la fase beta metaestable comienza a retenerse. Cuando el contenido de niobio llega a ser del 30% p / v o más alto, la fase beta se retuvo casi por completo.

Además, las aleaciones de Ti en fase beta parecen ser un material muy prometedor para aplicaciones biomédicas, debido a su bajo módulo elástico y mayor resistencia a la corrosión (79). Los módulos elásticos de diferentes aleaciones de Ti en fase beta se enumeran en la tabla 2. El comportamiento elástico de las aleaciones de Ti con estabilizador de fase beta depende en gran medida de las concentraciones de los estabilizadores dentro de la aleación. Sakaguchi y cols. investigaron el efecto del contenido de Ta (tantalio) en el módulo elástico de una aleación de Ti-30Nb- X Ta-5Zr (80). Informaron que para contenidos de Ta por debajo del 10% p / v, la aleación muestra un comportamiento de martensita inducida por estrés (SIM). A medida que el contenido de Ta aumenta al 10%, el módulo de Young disminuye y la aleación se vuelve más elástica. Cuando el contenido de Ta supera el 15% p / v, la fase beta predomina dentro de la aleación; por tanto, el módulo de elasticidad aumenta hacia el módulo de elasticidad

de Ta puro (181 GPa) (80). Por el contrario, Zhou y cols. informaron que el módulo de Young de la aleación Ti X Ta muestra su disminución máxima (65 GPa) en $X = 30\%$ p / v, luego alcanza su punto máximo en $X = 50\%$ p / v (90 GPa) y finalmente disminuye nuevamente (65 GPa) a $X = 70\%$ p / v (81). Además, Correa y cols. investigaron el efecto del contenido de Zr en el módulo de Young de Ti X Aleaciones de Zr ($X = 0, X = 5, X = 10, X = 15$). Los resultados indicaron que la elasticidad de la aleación aumenta con un contenido de Zr del 5% p / v, mientras que concentraciones más altas de Zr conducen a un aumento del módulo elástico de la aleación (82).

Tabla 3. Tipos de aleaciones utilizadas en la confección de implantes dentales

CONTENIDO DE ALEACIONES BETA	MÓDULO ELÁSTICO (GPa)	MÓDULO DE ELASTICIDAD DESPUÉS DEL ENVEJECIMIENTO (GPa)
Ti-15Zr	112	NR
Ti-15Zr-4Nb-4Ta-0,2Pd-0,2O-0,05N	100	97
Ti-10Zr	95	NR
Ti-15Zr-4Nb-4Ta-0,2Pd	94	99
Ti-16Nb-13Ta-4Mo	91	113
Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0,2Pd	89	103
Ti-5Zr	87	NR
Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0,2Pd-0,2O	86	98
Ti-15Zr-10Cr	80	NR
Ti-29Nb-13Ta	76	103
Ti-15Mo	75	NR
Ti-13Nb-13Zr	75	NR
Ti-29Nb-13Ta-4Mo	74	73

Ti-29Nb-13Ta-6Sn	74	73
Ti-29Nb-13Ta-2Sn	62	78
Ti-19Zr-10Nb-1Fe	59	NR
Ti-29Nb-13Ta-7Zr	53	NR
Ti-10Zr-5Nb-5Ta	43	NR

**Los tratamientos térmicos de los elementos son de bastante importancia para modificar sustancialmente sus propiedades, un fenómeno que afecta las aleaciones de estos, aún a temperatura ambiente, es conocido como envejecimiento natural, si se realiza a una temperatura mayor ocurre un tratamiento térmico de precipitación conocido como envejecimiento artificial.*

**NR: no referido*

1.4. Osteoblastos – Célula MG63

El aumento de la incidencia de problemas relacionados con los huesos y las articulaciones es una preocupación médica importante. Estos problemas relacionados con los huesos requieren el aumento de la tasa de proliferación celular del hueso y la de otras células asociadas para mejorar el proceso de cicatrización, reparación y regeneración tisular. Tal cicatrización y regeneración de tejidos generalmente se logra utilizando productos naturales (83) y sintéticos (84) que forman estructuras de andamiaje aplicadas a sitios dañados del hueso con forma definida de interés. Los andamios se pueden implantar sin células o presembrados con células óseas junto con biomoléculas para mejorar el crecimiento, la unión, la proliferación y la diferenciación celular sin ejercer ningún efecto tóxico. (85) Las biomoléculas que se utilizan actualmente, como los factores de crecimiento y otros fármacos comerciales utilizados para tratar los trastornos óseos, son costosas y limitadas debido a sus numerosos efectos secundarios indeseables. Por lo tanto, se requiere un enfoque alternativo para tratar los problemas relacionados con los huesos y las articulaciones utilizando biomoléculas naturales que

están comúnmente disponibles, son efectivas y seguras sin causar efectos secundarios indeseables (86).

Los osteoblastos establecidos, como las líneas celulares, son modelos útiles para estudiar el efecto de los fitoquímicos. Entre los diversos tipos de células, las células MG63 se han utilizado ampliamente como modelo experimental para estudiar una variedad de funciones diferentes, como la adhesión, la síntesis de matriz extracelular (ECM), la actividad biológica, etc., ya que la función MG63 se parece mucho a la de las células osteoblásticas humanas (87).

Las líneas celulares de osteosarcoma humano pueden contribuir a nuestra comprensión de la función de los osteoblastos porque inicialmente representan poblaciones clonales derivadas de etapas específicas del linaje de osteoblastos.

Tabla 4. Características de la línea celular MG63

Nombre	MG-63
Descripción	Osteosarcoma humano
Morfología	Fibroblasto
Medio de cultivo	EMEM con BSS de Earle + 2 mM GLUTAMINA modificada que contiene: 1,0 mM de piruvato sódico, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1,5 g/L de bicarbonato sódico y suplementado con 10% Suero bovino fetal inactivado. Este medio está formulado para su uso en atmósfera con 5% de CO ₂ .
Procedimiento de subcultivo	Dividir los cultivos confluentes sembrando a 1:4 hasta 1:8 a una densidad de 1-3x10000células/cm ² usando tripsina/EDTA, 0,25%, 0,03% respectivamente. Se incuba a 37 C y 5% de CO ₂ . El medio debe renovarse cada 2-3 días.
Referencias	Billiau A, et al. Interferón humano: producción en masa en una línea celular recién establecida, MG-63. Antimicrobiano Agentes Quimioterapia. 12: 11-

	<p>15, 1977. Takeuchi Y, et al. Relación entre las acciones del factor de crecimiento transformante (TGF)-beta y la expresión en la superficie celular de sus receptores en células osteoblásticas clonales. J.Cell.Physiol.162:315-321,1995. Yee A, et al. Caracterización bioquímica de la proteína quinasa activadora de quinasa humana dependiente de ciclina. J. Biol. química 271: 471-477, 1996</p>
Comentarios	<p>Es una línea derivada de un humano, varón caucásico de 14 años. Se puede inducir la producción de altos niveles de interferón, usando ácido poliinosinico, ácido policitidilico, cicloheximida y actinomicina D. Antigenicamente, parece que el interferón de MG-63 está más relacionado con el fibroblasto humano que con el interferón de leucocito</p>

Sin embargo, para que estas líneas celulares produzcan datos de relevancia fisiológica, es importante que las diferentes líneas celulares de osteosarcoma se caractericen ampliamente y se elija para investigación la línea celular cuya función particular se parezca más a la exhibida por células similares a osteoblastos humanos. Las líneas celulares que poseen diferentes características se pueden usar para un estudio comparativo para determinar la importancia de una función celular particular (88).

1.5. Osteointegración

Como material bioinerte, el titanio permite una aposición cercana del hueso en las condiciones adecuadas. Este procedimiento se denomina osteointegración (89) y comienza con la absorción de iones, proteínas, polisacáridos y proteoglicanos por la capa de óxido de titanio. Posteriormente, los macrófagos, neutrófilos y células osteoprogenitoras migran en la interfaz hueso-implante y conducen a la aposición ósea en estrecho contacto con la superficie del implante (90). Aunque se puede observar un contacto directo entre el hueso y el implante, esta situación no es común. Con mayor

frecuencia, hay una zona amorfa delgada o lámina limitante, que parece tener un grosor de 20 a 50 nm, o según otros estudios es mayor, aunque no supera los 400 nm. El procedimiento de osteointegración requiere un período de tiempo de al menos 3-5 meses para ser adecuado, un hecho que a menudo complica la carga inmediata de implantes ortopédicos y dentales (91).

La osteointegración propiamente dicha, implica la incorporación de un componente no vital en el hueso vivo que conduce a un mecanismo de anclaje eficiente, confiable y predecible (92). Para lograr una osteointegración exitosa, un implante debe tener una conexión firme e inamovible (sin micro-movimiento en el sitio óseo) entre la superficie del biomaterial del implante y el tejido óseo circundante conocido también como estabilidad primaria (93). El resultado favorable del tratamiento de los implantes de titanio, *in vivo*, también se basa en la respuesta biológica de estos implantes a las células osteogénicas, es decir, los osteoblastos durante el período de cicatrización. Sin embargo, a pesar de todas estas ventajas, los implantes de titanio tienen sus propias limitaciones (94). Por lo tanto, con el fin de promover la bioactividad y mejorar la integración ósea, se están estudiando ampliamente numerosos métodos relacionados con modificaciones superficiales o recubrimientos de implantes de titanio. Las modificaciones de la superficie tales como plasma de titanio - pulverización, granallado, anodización, grabado ácido o revestimientos de fosfato cálcico se investigan ampliamente (95). Sin embargo, se justifica una mayor investigación sobre la respuesta del tejido periimplantario a los nuevos recubrimientos o la modificación de la superficie de los implantes, ya que la dinámica óptima de la osteointegración del implante sigue siendo difícil de alcanzar. El hueso sano, un tipo de tejido heterogéneo, que incorpora el implante de titanio, se compone de matriz extracelular ósea (MEC), secretada principalmente por los

osteoblastos. La MEC ósea está hecha de numerosas proteínas como proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas, colágeno tipo I, proteínas no colágenas, fibronectina, etc., y regula las interacciones entre la célula y la matriz, incluida la relación entre osteoblastos y osteoclastos, influye en la diferenciación de células madre mesenquimales y sirve como una plataforma crítica sobre la cual tiene lugar la mineralización en el hueso (95).

Actualmente, se están explorando varios enfoques de ingeniería de tejidos con andamiaje bioactivo para regenerar tejido óseo dirigiendo la diferenciación de células madre mesenquimales a linajes osteogénicos. Curiosamente, el andamio nanofibroso electrohilado fabricado artificialmente imita la forma y función de la MEC. El andamio nanofibroso electrohilado poroso tridimensional exhibe una alta relación superficie-volumen y facilita el transporte de nutrientes, la unión celular, la adhesión, la migración, la proliferación y la función diferenciada (96).

Estudios preliminares *in vivo* confirman la bioactividad de nuevos recubrimientos nanofibrosos osteogénicos sobre implantes de titanio lo intensificando aún más los intentos de fabricar una superficie de implante ideal.

En esta investigación, se realiza una evaluación elaborada y detallada de implantes osteogénicos de titanio recubiertos de nanofibras en modelos de estudio de conejos. El recubrimiento nanofibroso alrededor del implante de titanio imita la MEC y posee características osteoinductivas y osteoconductoras (95). Se presume que el recubrimiento osteogénico de nanofibras sobre implantes de titanio actuará como una MEC artificial en la zona periimplantaria y proporcionará un microambiente *in vivo* tridimensional para que las células madre mesenquimales en la región periimplantaria crezcan, proliferen y

se diferencien al linaje osteogénico, lo que dará como resultado una osteointegración mejorada y rápida.

A pesar de los avances recientes, la modificación de la superficie ideal del implante de titanio para una osteointegración óptima es todavía un tema sin resolver (97).

En los seres humanos, un implante de titanio generalmente implica un período prolongado de tres a cuatro meses para integrarse con el hueso. Además, se ha afirmado que la regeneración del tejido óseo en modelos de estudio de conejos es bastante rápida y todos los eventos relacionados con la curación pueden extenderse por un período de aproximadamente seis semanas (98). Este es un método eficiente, económico y reproducible para fabricar un recubrimiento de nanofibras osteogénicas en la superficie del implante de titanio y su subsiguiente respuesta in vivo en modelos de conejos. El carácter distintivo de estos implantes recubiertos es la fabricación exitosa de nanofibras osteogénicas ultrafinas biodegradables, que imitan la MEC que proporciona regiones como nichos de células madre. Estas regiones se utilizan favorablemente por las células madre mesenquimales para la unión, el crecimiento, la proliferación y la diferenciación, lo que da como resultado la promoción de la osteointegración. Tales características, como una malla altamente porosa e interconectada con una gran proporción de superficie a volumen, junto con el abordaje sistémico de las limitaciones intrínsecas asociadas, son por lo demás difíciles de lograr en los implantes metálicos convencionales. Se sugirió que los implantes osteogénicos recubiertos de nanofibras promulgaran una capa superficial más porosa e interconectada en contraste con los implantes usados comercialmente (95).

El titanio y las aleaciones de titanio, como metales inertes, carecen de la capacidad de estimular la proliferación de osteoblastos y células óseas, y dependen principalmente

del bloqueo mecánico con el hueso alveolar para proporcionar retención. La densa capa de óxido de titanio sobre la superficie de titanio difícilmente puede inducir la deposición de apatita similar al hueso en el fluido corporal simulado o en el cuerpo del implante de titanio, pero forma una osteointegración general con el tejido óseo. El tratamiento de activación de la superficie de titanio y aleación de titanio puede mejorar la combinación de implante y hueso y prevenir la reabsorción ósea alrededor del implante. En la actualidad, al estudiar el mecanismo de interacción entre el implante y el hospedador biológico, se encuentra que la composición química, la estructura topológica, la energía superficial, la hidrofiliidad y la hidrofobicidad de la superficie del material afectarán la combinación entre este y el hospedador biológico (99).

1.6. Fases de tratamiento de superficie y cicatrización del titanio

Para conocer la fase de cicatrización del titanio, sus propiedades osteogénicas y antibacterianas de los recubrimientos de superficies del implante, se pueden estudiar tres aspectos: físico, químico y biológico.

1.6.1. Modificación física

1.6.1.1. Pulido con chorro de arena y grabado ácido

Las características de la superficie de los implantes afectan al comportamiento del hueso circundante y, en consecuencia, al proceso de osteointegración del implante. Varios estudios han informado que los implantes con superficies rugosas mostraron un mejor comportamiento y mayores tasas de supervivencia en comparación con los mecanizados (100).

El arenado es el uso de un chorro de alta velocidad formado por aire comprimido para rociar diferentes tamaños de partículas en la superficie del implante para cambiar la

rugosidad de la superficie del implante. El pulido con chorro de arena puede aumentar la superficie del implante, promover la adhesión y la proliferación celular y mejorar la osteointegración. Valverde y cols. (101) informaron que ajustar el tamaño de partícula y la velocidad de rociado de arenado durante el proceso de arenado puede cambiar la morfología microscópica y la rugosidad de la superficie del implante de titanio.

Linez-Bataillon y cols. cambiaron la rugosidad de la superficie de la aleación de titanio Ti6Al4V ajustando los parámetros de arenado, y encontraron que la reducción de la rugosidad reduciría la adhesión del osteoblasto MC3T3-E1 de ratón en la superficie de Ti6Al4V y la expresión de proteínas relacionadas. El proceso de modificación de la superficie de pulido con chorro de arena y grabado con ácido consiste en utilizar primero material de granallado de gran tamaño para pulir con chorro de arena y así obtener una estructura rugosa de 10 ~ 30 μm , y luego usar ácido mixto (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, HNO₃ o su mezcla) para grabar con la superficie del implante de titanio puro a alta temperatura y obtener una estructura secundaria rugosa formada por microporos de 1 a 3 μm . La estructura rugosa primaria favorece la adhesión de los osteoblastos y la estructura rugosa secundaria puede promover la proliferación y diferenciación de los mismos. La morfología de la superficie de esta estructura rugosa multinivel favorece la integración entre los implantes y el hueso. Pinholt encontró que la tasa de supervivencia de los implantes rugosos fue del 98%, mientras que la de los implantes mecanizados fue del 81%, en un período de seguimiento de 20 a 27 meses (102). Además, Gotfredsen y cols. revelaron que los implantes chorreados con partículas de dióxido de titanio mostraron un mejor anclaje y contacto hueso-implante que los implantes mecanizados (103). La superioridad de los implantes rugosos sobre los mecanizados con respecto a la formación ósea se basa en la modificación de la microtopografía de la superficie y la alteración de

la energía de la superficie que conduce a la absorción de proteínas y componentes sanguíneos mejorando la unión celular y la osteointegración del implante (104).

Sobre la base de este hallazgo, se han intentado varias modificaciones de la superficie para producir superficies de titanio microrrugosas, incluido el pulido con arena, el grabado ácido y las alteraciones de la química de la superficie, con el fin de mejorar el proceso de osteointegración de estos implantes. El proceso de granallado se basa en partículas abrasivas (es decir, alúmina, corindón, rutilo e hidroxiapatita) forzadas contra la superficie del implante. En cuanto al proceso de grabado ácido de superficies de titanio, se utilizan como ácidos el HCl, H₂SO₄ y HF, ya que pueden reaccionar con la capa de óxido formada en la superficie de titanio. En cuanto a la química de la superficie, se alteran las interacciones iónicas, la absorción de proteínas y la actividad celular en la superficie del implante, lo que da lugar a modificaciones de eventos biológicos como la osteointegración (105).

Específicamente, Abdel-Haq y cols. encontraron que los implantes grabados con ácido y pulidos con chorro de arena modificados químicamente lograron un mayor contacto hueso-implante en comparación con los implantes grabados con ácido pulidos con chorro de arena estándar en las primeras semanas de cicatrización, mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contacto con el hueso entre los dos tipos de implantes después de seis semanas de cicatrización (106). Cabe mencionar que la alteración química de la superficie por enjuague con nitrógeno y almacenamiento en una solución de cloruro de sodio (NaCl) da como resultado una mayor humectabilidad e hidrofiliidad de la superficie del titanio (106). Varios estudios han informado de que la naturaleza hidrófila de los implantes que fueron modificados mediante chorro de arena y grabado con ácido mejoró su osteointegración en comparación

con los implantes rugosos no modificados (107). Del mismo modo, Patel y cols. apoyaron la importancia de la humectabilidad e hidrofilia de los implantes micro-rugosos en la unión celular y, posteriormente, en su osteointegración efectiva. Mencionaron que la hidrofilia de los implantes de titanio microrrugosos aumentó después de cada uno de los siguientes procedimientos de tratamiento: (a) enjuague con agua desionizada seguido de secado con nitrógeno, (b) sonicación en metanol, (c) deposición de TiO₂ de 10 nm de espesor y finalmente (d) lavado con agua y secado con nitrógeno de las muestras de titanio rugosas cubiertas con la capa de TiO₂ (108). Además, los mismos autores afirmaron que la alta hidrofilia se atribuye a la eliminación de los contaminantes superficiales inorgánicos y orgánicos mediante el tratamiento de limpieza. Finalmente, un estudio prospectivo de Karabuda y cols. demostró que la diferencia de pérdida de hueso marginal era estadísticamente significativa entre los implantes estándar y modificados pulidos con chorro de arena y grabados con ácido después de 15 meses de evaluación, mientras que la diferencia de las tasas de supervivencia entre los dos tipos de implantes no fue estadísticamente significativa (109).

1.6.1.2. Doble grabado ácido

La superficie de doble grabado ácido (DAE), está marcada por una mayor humectabilidad y adhesión celular, así como una mayor proliferación bacteriana (110, 111).

Un estudio reciente ha demostrado que los discos DAE se caracterizan por un aumento del crecimiento celular, la adhesión celular y una mejora de los eventos osteogénicos y angiogénicos, así como el proceso de osteointegración, con respecto a las muestras mecanizadas (112). Los estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM)

demonstraron que el tratamiento de doble grabado mejoraba la formación de una superficie de nano-rugosidad, y la rugosidad media (Ra) se mantuvo por debajo de 0,2 μm .

La nano-rugosidad es fundamental para el aumento de la adsorción de proteínas y la modulación de la señalización celular (111, 113).

En este estudio, los discos DAE, en la observación al microscopio electrónico de barrido (SEM), mostraron una mayor porosidad con respecto a la superficie grabada simple, con poros de una medida comprendida entre 200 nm y 4 μm . Las mediciones de las propiedades humectantes mostraron que las superficies DAE se caracterizaban por una mayor hidrofilia con respecto a otros grupos. Este estudio demostró que el tratamiento con doble ácido en los discos de titanio dio lugar a mayor nano-rugosidad superficial, una mayor hidrofiliidad y mejoró la composición de oxígeno de la capa superficial, promoviendo una disminución notable en la formación de biopelículas de *S. oralis* con respecto al titanio mecanizado y de un solo grabado. Dentro de los límites de este estudio, el DAE puede considerarse un tratamiento prometedor para contrarrestar la colonización de microorganismos pioneros, como *S. oralis*.

El mejor rendimiento de DAE en términos de inhibición de la adhesión de *S. oralis* puede influir en la formación de biopelícula / placa y luego disminuir el riesgo de enfermedades periimplantarias.

Las investigaciones futuras deberán tomar medidas para recapitular con mayor precisión la interacción entre la superficie de DAE y la biopelícula, *in vitro* e *in vivo*.

El estudio actual abre la posibilidad de un nuevo tipo de superficie que presenta características prometedoras para aplicaciones clínicas.

1.6.1.3. Tratamiento con plasma

1.6.1.3.1. Pulverización de plasma

La tecnología de pulverización de plasma utiliza un arco de plasma impulsado por una corriente continua como fuente de calor, ioniza gas inerte (plasma) para generar calor, calienta cerámicas, aleaciones, metales y otros materiales a un estado fundido o semifundido y los pulveriza sobre la superficie de implante pretratada a alta velocidad. Es el método de formación de un revestimiento de superficie fuerte. La pulverización de plasma tiene las ventajas de una velocidad de deposición rápida, un gran espesor de deposición y un bajo costo. El recubrimiento de hidroxiapatita (HA), que se utiliza comúnmente en la práctica clínica, es un recubrimiento formado mediante la pulverización de partículas de HA sobre la superficie del implante después de un enfriamiento rápido a alta temperatura. Los implantes rociados con recubrimiento de HA pueden promover la osteointegración y la reparación rápida del hueso después de ser implantados en el cuerpo (114). Sin embargo, los recubrimientos de HA también tienen algunas deficiencias, como daño por fragilidad al recubrimiento; deslaminación entre el recubrimiento y el sustrato debido a cambios en la fuerza de unión, lo que resulta en una mala adhesión en la interfase; además, el proceso de recubrimiento también puede causar el cambio de la estructura de HA. En los últimos años también se ha prestado atención a los recubrimientos de titanio poroso, Cunha y cols. (115) han demostrado que la pulverización con plasma atmosférico de los recubrimientos de titanio poroso puede mejorar la capacidad de osteointegración de los implantes de titanio.

1.6.1.3.2. Implantación de iones

La tecnología de implantación de iones consiste en inyectar un haz de iones en el implante. El haz de iones interactúa física y químicamente con los átomos o moléculas del implante. La energía de los iones incidentes se pierde gradual y finalmente permanece en el implante, alterando la composición de la superficie, estructura y el rendimiento. El estudio de Da Silva y cols. (116), muestra que la implantación de iones de nitrógeno en el titanio y sus aleaciones puede mejorar sus propiedades mecánicas. Para ello utilizaron una mezcla de gas N_2 / H_2 para modificar la aleación de titanio mediante la implantación de iones. Cuando el tiempo de inyección de la mezcla de gas alcanza los 90 minutos, se puede obtener la penetración máxima de nitrógeno, aproximadamente 88 nm. La dureza de la muestra modificada se mantiene relativamente sin cambios.

Cao y cols. (117) utilizaron tecnología de implantación de iones para implantar iones de plata en la superficie de titanio. A medida que aumenta el tiempo de implantación, el tamaño de las nanopartículas de plata se hace más grande y la resistencia a la corrosión de la muestra modificada disminuye, y puede inhibir la adherencia de *Staphylococcus aureus*. El crecimiento de *Escherichia spp.* aumenta la proliferación de la línea celular similar a osteoblastos MG63. Con la tecnología de implantación de iones, la implantación de algunos iones de metales pesados puede mejorar las propiedades antibacterianas del titanio. Wan y cols. (118) utilizaron tecnología de implantación de iones para inyectar cobre y plata en la aleación de titanio. La muestra modificada tiene buenas propiedades antibacterianas contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y el coeficiente de fricción también se reduce. La resistencia a la corrosión de la muestra se reduce ligeramente.

1.6.1.4. Deposición física de vapor

La tecnología de deposición física de vapor es una tecnología que vaporiza la superficie de la fuente de material en condiciones de vacío y la deposita sobre la superficie del implante a baja presión para formar una película funcional. La pulverización catódica con magnetrón es una tecnología de deposición física de vapor relativamente madura, que se utiliza para modificar la superficie del implante para aumentar la velocidad de contacto hueso-implante (119). Xu y cols. (120) encontraron que la película de óxido de titanio preparada por el método de pulverización catódica con magnetrón tiene una buena compatibilidad con la sangre.

1.6.1.5. Tratamiento con láser

La tecnología de fusión selectiva por láser (SLM) es una tecnología en la que el polvo metálico se derrite completamente bajo el calor de un rayo láser y luego se enfría y solidifica para formar una tecnología. Tiene una amplia gama de aplicaciones en la modificación de superficies de implantes (121). Qin y cols. (122) utilizaron el proceso SLM para fabricar un implante de aleación de titanio Ti6Al4V con una superficie microestructurada, y luego lo nanoestructuraron mediante anodización electroquímica para formar nanotubos de dióxido de titanio, por último, lo activaron biológicamente a través de un recubrimiento de HA. Los osteoblastos primarios y los modelos de líneas celulares probaron las características osteogénicas de los implantes modificados. Los resultados mostraron que la expresión de los genes tardíos de osteoblastos / osteocitos *gjal* y *phex* fue mejorada, lo que indica que la modificación técnica puede promover la maduración y la mineralización celular en la superficie del implante. La desventaja de la tecnología SLM es que la superficie rugosa de los implantes de titanio modificados por

SLM puede promover la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas, por lo que es necesario combinar otros medios para dar a los implantes efectos antibacterianos. Hu y cols. (123) utilizaron técnicas de arenado, oxidación anódica y deposición electroquímica para construir una estructura de nanotubos compuestos de dióxido de titanio sobre un sustrato de titanio modificado con SLM con una microestructura, que puede mejorar el efecto antibacteriano de la superficie SLM.

1.6.2. Modificación electroquímica

1.6.2.1. Anodizado

La anodización es la formación de películas de óxido en la superficie del metal a través de la oxidación por descarga, que es un método muy maduro de modificación de la superficie de los materiales metálicos. Bajo la acción de un campo eléctrico, los iones positivos y negativos del electrolito se difunden hacia el ánodo y el cátodo, y se produce la reacción redox. Se produce la formación y desaparición de la película de óxido en la superficie del titanio alternativa y finalmente se producen micro-nano poros uniformes; o se forman pequeños tubos en la superficie del metal de titanio. En el proceso de oxidación anódica, el material a base de titanio a oxidar se fija en el ánodo de la celda electrolítica, y las propiedades de la película de óxido anódico generada se pueden ajustar ajustando el voltaje entre los dos electrodos y el tiempo de tratamiento. La capa puede cambiar el color de la superficie, la resistencia a la corrosión, la dureza y otras propiedades del material a base de titanio. Al cambiar los parámetros de procesamiento, se pueden producir varias estructuras de superficie como nanotubos, nanoporos, nanobarras y micro-nano texturas en la superficie de materiales a base de titanio mediante la anodización en diferentes electrolitos. El titanio está recubierto por una capa superficial de óxido de 1,5 a 10 nm de espesor que se forma naturalmente en la superficie del titanio

al exponerse al aire a temperatura ambiente (124). En consecuencia, la oxidación anódica de la superficie del titanio da como resultado la producción de una película de óxido más gruesa que la formada espontáneamente en la superficie del metal. Cabe mencionar que la película de óxido tiene un papel muy importante en la biocompatibilidad del implante, ya que es esta superficie y no el cuerpo principal del implante de titanio la que entra en contacto directo con el tejido óseo. Basándose en este hecho, se han investigado muchas modificaciones de la superficie para mejorar las propiedades de esta fina capa de óxido. Entre las diversas técnicas, la oxidación anódica es un método bien establecido y prometedor, ya que puede producir diferentes tipos de películas de óxido sobre superficies de titanio. El engrosamiento de la película de óxido obtenida por la oxidación anódica puede contribuir al aumento de la resistencia a la corrosión y al desgaste, así como a la mejora de la adherencia y la unión (125).

Las propiedades de la capa de óxido formada dependen de los parámetros del proceso, como el voltaje del ánodo y la composición del electrolito. En cuanto al voltaje aplicado, los voltajes altos producen películas de óxido gruesas y porosas, mientras que los voltajes bajos producen películas delgadas y compactas. En cuanto al electrolito, para la anodización del titanio se pueden utilizar diferentes ácidos como H_2SO_4 , H_3PO_4 y ácido acético, sales neutras y soluciones alcalinas. Los electrolitos alcalinos, como el hidróxido de calcio y el hidróxido de sodio, revelaron una capacidad relativamente menor de formación de óxido anódico que los ácidos (126).

La capa de óxido de titanio muestra tres formas cristalinas diferentes: anatasa (tetragonal), rutilo (tetragonal) y brookita (ortorrómbica). Las estructuras de anatasa y rutilo de la capa de óxido de titanio tienen la capacidad de formar hidroxiapatita, un material bioactivo que puede inducir la unión bioactiva con el hueso circundante

mejorando la osteointegración (127). Yang y cols. han demostrado que la oxidación anódica en una solución de H_2SO_4 combinada con un tratamiento térmico a $600\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h condujo a la formación de apatita debido al aumento de las estructuras de anatasa y rutilo en la capa de óxido de titanio (128). El tratamiento de oxidación anódica condujo a un aumento de la resistencia a la corrosión de los implantes de titanio. Leinenbach y Eifler (129) investigaron la influencia del tratamiento de oxidación en el comportamiento de fatiga del titanio y encontraron que la película de óxido obtenida por la oxidación anódica podía soportar mayores amplitudes de tensión (325 Mpa) y mayores deformaciones plásticas (antes del primer daño superficial) que las películas de óxido producidas por oxidación térmica (275 MPa).

En estado natural, se forma dióxido de titanio no biológicamente activo en la superficie de los implantes de titanio. Después del tratamiento de anodización, se forman dióxido de titanio rutilo biológicamente activo (Rutilo) y dióxido de titanio anatasa (Anatasa) en la superficie del implante. Diamanti y cols. (130) sumergieron titanio en una solución de electrolito de ácido sulfúrico para la oxidación anódica y encontraron que aumentar la densidad de corriente o reducir la concentración de electrolito puede aumentar la proporción de anatasa generada en la superficie del titanio. Yang y cols. (131) encontraron que en una solución de ácido sulfúrico se formó un dióxido de titanio de fase mixta de rutilo y anatasa poroso nanoestructurado sobre la superficie de titanio, el óxido hace que aparezcan una gran cantidad de grupos hidroxilo de titanio en la superficie del titanio, lo que promueve la deposición de HA y la adhesión de los osteoblastos.

En el método de tratamiento de superficie de oxidación anódica, la composición de electrolito tiene una mayor influencia sobre la composición del recubrimiento de óxido

depositado. Al disolver las sales de elementos funcionales biológicos (tales como calcio, fósforo, plata y cobre) en el electrolito, los elementos funcionales biológicos pueden incorporarse al óxido, modificando así la composición y las propiedades del revestimiento. El recubrimiento de calcio-fósforo tiene una relación calcio-fósforo similar a la de la HA natural, que puede promover el contacto directo hueso-implante. Otros elementos como el estroncio, el manganeso y el zinc se incorporan al recubrimiento para promover la osteointegración y la regeneración ósea. Para reducir las infecciones asociadas con los implantes, se pueden incorporar elementos metálicos antibacterianos como la plata, el cobre y el zinc en el recubrimiento de óxido anódico para inhibir la adhesión inicial de bacterias. Entre estos elementos, aunque la plata es el bactericida más fuerte, su liberación explosiva puede estimular la citotoxicidad. Wu y cols. (132) introdujeron cobre en la capa de óxido anódico durante el tratamiento hidrotermal y cultivaron células madre de médula ósea de rata en las muestras con cobre incorporado. La expresión de factores relacionados con la angiogénesis y genes relacionados con la osteogénesis de las células aumentó; el recubrimiento de dióxido de titanio y cobre regulado e incorporado tiene una buena actividad antibacteriana.

En 1999, Zwilling y cols. (133) informaron que se puede preparar dióxido de titanio nanoporoso / tubular en una solución acuosa de ácido fluorhídrico. Gong y cols. (134) tomaron la iniciativa en la aplicación del método de oxidación anódica a la preparación de matrices de nanotubos de dióxido de titanio. Debido a que los nanotubos tienen una estructura tubular hueca, su área de superficie específica y su fuerte capacidad de adsorción mejoran en gran medida la actividad biológica del titanio. Das y cols. (135) produjeron nanotubos de dióxido de titanio por oxidación anódica y luego lo trataron con deposición de plata. Estos nanotubos pueden promover la adhesión y proliferación de

osteoblastos, y pueden actuar como portadores de nanoplata para inhibir bacterias. Los nanotubos de dióxido de titanio fabricados con materiales a base de titanio mediante oxidación anódica no solo pueden regular directamente el comportamiento celular, sino que también sirven como portadores de moléculas biológicamente activas, y la liberación de moléculas activas puede controlarse cambiando el tamaño de los nanotubos. El efecto sinérgico proporcionado por los factores de crecimiento cargados (como la proteína morfogenética ósea 2) y la geometría de la superficie a nanoescala de los nanotubos de dióxido de titanio pueden mejorar la osteointegración de los implantes basados en titanio (136).

1.6.2.2. Oxidación por microarco (MAO)

La tecnología MAO es un método de modificación que genera un recubrimiento bioactivo in situ en la superficie de metales no ferrosos y es una actualización de la tecnología de anodización. Al ajustar el electrolito y los parámetros correspondientes de voltaje o corriente, utilizando el efecto instantáneo de alta temperatura generado por la descarga del arco, se forma una capa de decenas de micrones de espesor, una capa interna densa y una capa externa porosa en la superficie de titanio y aleación de titanio.

El recubrimiento de titanio micro-nano bioactivo formado por la modificación de MAO puede promover la adhesión de las células en la superficie del implante y mejorar la adhesión (137). Du y cols. (138) optimizaron el recubrimiento de MAO incorporando elementos de zinc, calcio y fósforo, y su fuerza de unión podría ser tan alta como 45 ± 5 MPa, mostrando una buena capacidad para inducir la deposición de apatita. *Staphylococcus aureus* también tiene buena capacidad antibacteriana. La mejora de la capacidad antibacteriana de la superficie del revestimiento MAO depende del efecto

combinado de los elementos dopados y las propiedades superficiales del revestimiento MAO. Du y cols. (138) utilizaron la tecnología MAO para preparar un recubrimiento de dióxido de titanio con una estructura micro-nano de doble escala en la superficie del titanio con un electrolito tetraborato. La superficie del recubrimiento forma una microestructura combinada con nanoporos, que exhibe superhidrofilicidad. Puede promover significativamente la adhesión, proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales de la médula ósea humana, tiene una excelente osteointegración y puede mejorar la tasa de éxito de la implantación. Li y cols. (139) utilizaron la tecnología MAO para preparar recubrimientos porosos de dióxido de titanio sobre titanio de grano ultrafino en un electrolito que contiene calcio, fósforo y silicio. El recubrimiento tiene una alta energía superficial y una gran rugosidad de la superficie. Promueve mejor la adhesión y propagación de osteoblastos.

1.6.2.3. Método sol-gel

El método sol-gel es un método en el que el material base se sumerge en la solución precursora sol-gel y se extrae y sinteriza repetidamente para obtener una capa superficial biológicamente activa. Wen y cols (140) utilizaron este método para preparar recubrimientos de HA / dióxido de titanio en la superficie de aleaciones de titanio. Después de sumergirlos en fluidos corporales simulados, se puede ver la formación de apatita similar a hueso, mostrando una buena actividad biológica. La desventaja es que a menudo se observan grietas en el revestimiento obtenido por este método. Según los informes (141), el espesor del revestimiento inferior a 0,5 μm puede reducir la aparición de grietas. Al igual que otros métodos de deposición térmica, el método sol-gel debe considerar el impacto de los efectos térmicos, por lo que su uso clínico actual está sujeto a ciertas restricciones.

1.6.3. Tratamiento químico

1.6.3.1. Tratamiento térmico alcalino

La tecnología de tratamiento térmico con álcali consiste en sumergir el implante de titanio en una cierta concentración de solución alcalina fuerte durante un período de tiempo y luego calentarlo a 300-800 ° C para obtener una capa de óxido porosa. Nishio y cols. (142) encontraron que la rugosidad de la superficie del titanio aumenta considerablemente después del tratamiento térmico con álcali. Después de sumergirlo en un fluido corporal simulado, el compuesto de titanio con una estructura porosa del tamaño de una micra como punto de nucleación puede inducir la deposición de apatita. Zhang y cols. (143) realizaron un tratamiento térmico continuo con álcali, precalcificación e inmersión simulada en fluidos corporales sobre titanio poroso para obtener titanio poroso recubierto de HA. El estudio de transducción de señales moleculares del contenido sérico de fosfatasa alcalina y osteocalcina reveló además que el titanio poroso recubierto de HA tiene un efecto sinérgico en la mejora de la eficiencia de la reparación ósea.

1.6.3.2. Tratamiento ácido-base en dos etapas

El método de dos pasos ácido-base consiste en corroer primero la superficie del material con una cierta concentración de solución ácida para obtener un área de superficie más grande, y luego tratar la superficie del material con una cierta concentración de solución alcalina para obtener una superficie rugosa y una capa de modificación de superficie gruesa. El estudio de Ban y cols. (144) mostró que cuando se usa el método de dos pasos ácido-base para tratar materiales, el efecto principal del paso de tratamiento con ácido es aumentar la rugosidad de la superficie del titanio. El tratamiento puede promover la HA más que simplemente usando un tratamiento térmico con álcali en la

superficie de titanio. La rápida deposición y la fuerza de unión de la HA depositado y el sustrato de titanio es más fuerte.

1.6.3.3. Deposición de vapor químico (CVD)

La deposición de vapor químico es un proceso que resulta en la deposición de un material sólido en la superficie de un sustrato a partir de la reacción química entre precursores gaseosos y la superficie calentada del sustrato metálico (145-146). Un sistema de suministro de gas proporciona a la cámara del reactor del aparato CVD gases químicos que entran en contacto con un sustrato metálico calentado para reaccionar y descomponerlo, formando una fase sólida que recubre el sustrato metálico. El calentamiento del sustrato puede realizarse mediante hornos tubulares, lámparas halógenas, láseres de calentamiento por inducción o luz ultravioleta. Además, los precursores gaseosos pueden ser haluros, hidruros y diversos compuestos metálicos tales como carbonilos y alcóxidos. Durante este proceso, se producen subproductos químicos que se eliminan de la cámara del reactor junto con los gases precursores sin reaccionar a través de un sistema de escape y vacío. Se han utilizado varios tipos de procesos de CVD, como el CVD a presión atmosférica, el CVD a baja presión, el CVD metal orgánico, el CVD asistido por plasma, el CVD láser, el CVD fotoquímico, la infiltración de vapor y el haz químicos (146).

Entre las diversas aplicaciones del CVD (145), la formación de un recubrimiento sólido en la superficie metálica resistente a la corrosión y al desgaste es un método atractivo para la preparación de la superficie de implantes destinados a un entorno altamente corrosivo como el del cuerpo humano (147). Se ha demostrado que el proceso CVD de los implantes de titanio mejora la resistencia al desgaste y a la corrosión de estos

materiales. Además, muchos autores encontraron que el recubrimiento de carbono tipo diamante (DLC, una forma amorfa de carbono) producido por varios métodos de CVD en las superficies de titanio tiene propiedades mecánicas mejoradas, como resistencia al desgaste y a la corrosión, junto con una buena biocompatibilidad (148). Sin embargo, debe mencionarse que la expansión térmica de la película de diamante es muy diferente de la expansión térmica del titanio, lo que conduce a una mala adhesión de la película sobre el sustrato de titanio. Se ha demostrado que este inconveniente puede superarse mediante el uso de una capa intermedia para mejorar la adherencia del revestimiento DLC (149). Específicamente, Kim y cols. preparó aleaciones de Ti recubiertas con DLC con la incorporación de una capa intermedia de silicio amorfo utilizando la técnica CVD asistida por plasma y encontró una mejora en la resistencia a la corrosión en un ambiente corrosivo simulado del fluido corporal mediante una solución de NaCl al 0,89%. Este hallazgo está de acuerdo con el resultado de otro estudio, que demostró que la resistencia al desgaste de una capa de DLC de 1 μm de espesor era estadísticamente significativa más alta que la de las superficies de titanio sin recubrimiento. Además, la naturaleza anticorrosiva de la capa de silicio incorporada a las superficies de titanio también ha sido apoyada por otros estudios. Por último, a excepción del recubrimiento DLC, la formación de una capa de carburo de titanio sobre la superficie de titanio por una CVD de plasma triodo mejorada con iones condujo a una alta resistencia a la abrasión que fomenta el uso de esta capa como material de implante resistente a la abrasión (150).

1.6.3.4. Tratamiento alcalino: recubrimiento de iones de calcio y fosfato (CaP)

Una superficie de Ti tratada con álcali está cargada negativamente. En consecuencia, en biofluidos acelulares simulados (SBF), tiende a absorber los iones de calcio cargados positivamente. A medida que avanza la acumulación de calcio, la superficie se vuelve más cargada positivamente, lo que lleva a la absorción de iones fosfato y, posteriormente, a la formación de apatita. Este procedimiento fue confirmado experimentalmente por espectroscopia de fotoelectrones de rayos X para diferentes intervalos de tiempo (151).

Además, para la formación de la capa de apatita, es esencial el tratamiento térmico después de la exposición a la solución alcalina. Más específicamente, cuando una superficie de Ti se expone a una solución alcalina (es decir, NaOH) se forma titanato de hidrógeno y sodio. Mediante tratamiento térmico, el titanato de hidrógeno y sodio se transforma en titanato de sodio ($\text{Na}_2 \text{Ti}_3 \text{O}_7$), que intercambia iones Na^+ por H_3O^+ en SBF.

En un estudio in vivo, Yan y cols. expusieron muestras rectangulares de Ti a una solución alcalina de NaOH 5 M a 60°C durante 24 horas y luego las trataron térmicamente a 600°C durante una hora. Posteriormente, las muestras se insertaron en ocho tibias de cuatro conejos. Ocho semanas después de la implantación, el hueso circundante tejido y laminar recién formado se observó en contacto directo con una capa de apatita en la superficie de las muestras. De manera similar, en otro estudio con animales, se expuso una varilla de metal Ti en una solución de NaOH 5 M a 60°C durante 24 h y se trató térmicamente a 600°C durante una hora. Cuatro semanas después de la implantación en un cóndilo femoral de conejo, se observaron islotes óseos incluso en la

parte más profunda de los poros de la superficie de la muestra. Tsukanaka y cols. investigaron la proliferación y diferenciación de osteoblastos alrededor de placas de cultivo cp-Ti tratadas con álcali y térmicamente, en una solución de NaOH 5 M a 60 ° C durante 24 horas y tratadas térmicamente a 600 ° C durante una hora, en comparación con placas de cp-Ti no tratadas, utilizando osteoblastos primarios fluorescentes (152). Se informó que se aceleró el inicio de la diferenciación en las placas tratadas con la superficie. Sin embargo, una vez iniciado el procedimiento no se identificaron diferencias importantes entre los dos grupos. No obstante, las observaciones de SEM han revelado que los osteoblastos de las placas tratadas en la superficie eran pequeños y redondos, mientras que los osteoblastos del grupo de la superficie no tratada eran más grandes y planos.

Con respecto a aleaciones de Ti, tratamientos alcalinos y de calor se han intentado en Ti-6Al-4V, Ti-6Al-2Nb-Ta, y aleaciones de Ti-15Mo-5Zr-3Al. La formación de apatita en SBF y la unión ósea se lograron en las superficies en todas las aleaciones mencionadas anteriormente y se atribuyen a elementos de aleación específicos (es decir, Al, V y Mo), mientras que, en otras aleaciones de Ti, que contienen Ta, Zr y Nb, como las aleaciones TNZT (Ti-Nb-Zr-Ta), se inhibe la liberación de sodio y se suprime la formación de apatita. Otra desventaja de las superficies de titanio tratadas térmicamente con álcali es que la formación de apatita es sensible incluso a una pequeña cantidad de iones Ca.

Los problemas anteriores han dado lugar a la sustitución del titanato de sodio por titanato de calcio. Después de la exposición en una solución de NaOH, el Ti-aleación se empapó en un 100 mM CaCl₂ solución a 40 ° C durante 24 horas. Este paso permite que los iones Na⁺ sean reemplazados por iones Ca²⁺ y, posteriormente, que el titanato de

sodio sea reemplazado por titanato de calcio. En SBF, los iones Ca^{2+} se reemplazan mediante intercambio con iones H_3O^+ , lo que resulta en la formación de TiOH en la superficie del metal Ti. Este procedimiento hace que la superficie se cargue más negativamente y se combina con el Ca^{2+} cargado de iones positivos que habían sido liberados. Luego, los iones de fosfato cargados negativamente son atraídos por los iones de Ca^{2+} , lo que da como resultado una apatita cristalina. Este tratamiento ha permitido la formación de apatita en nuevas aleaciones de Ti como Ti-15Zr-4Nb-4Ta, Ti-29Nb-13Zr-4.6Ta y Ti-35Nb-2Ta-3Zr-0.3 (153).

En cuanto a las aplicaciones clínicas de los tratamientos alcalinos y térmicos, se realizaron un total de 70 artroplastias de cadera en 58 pacientes (edad media 51,7 años), utilizando implantes ortopédicos hechos de Ti-6Al-2Nb-1Ta alcalino y tratados térmicamente. En un seguimiento medio de diez años, la tasa de supervivencia global fue del 98% (IC 95%). Se recuperaron dos implantes después de fallar debido a una infección profunda y una fractura periprotésica femoral, a las dos semanas y ocho años después de la implantación, y se les realizó un examen histológico, que reveló hueso recién crecido, incluso en el implante, que se recuperó tan pronto como dos semanas después de la implantación. Además, se aplicaron cinco dispositivos de fusión espinal, hechos de cp-Ti alcalino y tratado térmicamente, a cinco pacientes con un resultado muy satisfactorio y una rápida recuperación. Las aplicaciones futuras de la capa de apatita incluyen la utilización de estas capas como portadores de fármacos, como bisfosfonatos, factores de crecimiento y ADN (154).

1.6.3.5. Tratamiento ácido: Recubrimiento de iones de calcio y fosfato (CaP)

El tratamiento con ácido conduce a una superficie de titanio cargada positivamente que tiene afinidad para absorber iones fosfato cargados negativamente en SBF. Posteriormente, la acumulación de iones fosfato, que hace que la superficie del titanio se cargue progresivamente más negativamente, provoca la absorción de iones calcio. Este procedimiento conduce gradualmente a la formación de apatito en la superficie del titanio, como se confirmó mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos X.

Parece que el tratamiento térmico después de la exposición a una solución ácida mejora la formación de hueso. En un estudio con animales, dos muestras de Ti que habían sido expuestas a una solución ácida fuerte (solución de ácido sulfúrico al 66,3% p / p y solución de ácido clorhídrico al 10,6% p / p en una proporción en peso de 1: 1) durante una hora y tratados térmicamente a 600 ° C durante una hora más se implantaron en tibias de conejo. Cuatro semanas después, se observó hueso recién formado con fibras de colágeno paralelas en contacto directo con una muestra y, ocho semanas después, se había producido una remodelación ósea en la superficie de la segunda muestra. Por el contrario, en muestras que habían sido expuestas a agua pura en lugar de solución ácida antes del tratamiento térmico o que no habían sido tratadas térmicamente en absoluto, se observó encapsulación de tejido fibroso. Estos hallazgos concuerdan con otro estudio in vivo, en el que las muestras de Ti se expusieron a la misma solución ácida (H₂SO₄ / HCl) durante 30 min y se trataron térmicamente a 600 ° C durante una hora. Las muestras se insertaron en un músculo dorsal de un perro Beagle y después de doce meses se observó hueso ectópico recién formado en su superficie porosa y cargada (potencial zeta: 8,0 (± 2,0) mV). Por el contrario, en el mismo estudio, las muestras que no habían sido tratadas

térmicamente después de la exposición ácida o que habían sido expuestas a agua pura antes del tratamiento térmico no mostraron formación ósea en doce meses, carga superficial casi nula (potencial zeta: ~ 0 mV y $-2,1 (\pm 3,1)$ mV, respectivamente), y sin formación de apatita en la superficie después de incrustarse en SBF.

Las cosas se complican más cuando se trata de aleaciones de Ti. Los elementos de aleación forman otros óxidos, además de los óxidos de Ti, en la superficie de la aleación, lo que limita la capacidad de formación de apatita en SBF. Sin embargo, en el caso de Ti-15Zr-4Nb-4Ta, la exposición a una solución de NaOH, antes de la solución de HCl y el tratamiento térmico, dio como resultado una capa de óxido de titanio cargada positivamente y la formación de apatita en SBF (155).

Además, los hallazgos de los estudios anteriores indican que la exposición del titanio a una solución ácida y después tratamiento térmico no solo tiene propiedades osteoconductoras sino también osteoinductoras, debido a la formación de una capa de apatita en su superficie.

1.6.3.6. Modificación Bioquímica

La modificación bioquímica tiene como objetivo la utilización de las propiedades de adhesión y diferenciación celular para lograr una osteointegración y una adhesión ósea más rápidas. La inmovilización en la superficie de las proteínas de la matriz extracelular (MEC) y sus efectos en la estimulación ósea se han investigado a fondo. Más específicamente, se han realizado intentos para inmovilizar proteínas, péptidos y factores de crecimiento en las superficies de los implantes.

Entre las proteínas de la MEC, el colágeno I es un candidato muy prometedor para la inmovilización de proteínas. El procedimiento incluye la deposición de grupos amino

del plasma de alilamina, la colocación en una solución de colágeno tipo I al 0,1% a 37 °C durante la noche, para iniciar la fibrillogénesis, y la unión covalente obtenida por carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida en una solución acuosa. Morra y cols. han evaluado las propiedades regenerativas de los recubrimientos de colágeno I, *in vitro*, tanto en cultivos de células similares a osteoblastos (SaOS2) como en cultivos de células mesenquimales humanas (HMC). En el primer estudio, el titanio recubierto de colágeno (ColTi) y el titanio no recubierto (Ti) no tuvieron diferencias significativas con respecto al crecimiento de las células SaOS₂. Por el contrario, en el caso de HMC, ColTi estimuló la adhesión y la densidad celular en un corto tiempo experimental y los detalles de la superficie fueron seguidos completamente por los cuerpos celulares. Los hallazgos anteriores sugieren que la adhesión de las células similares a los osteoblastos está controlada por la topografía de la superficie, mientras que las HMC son estimuladas químicamente. En los estudios mencionados anteriormente, se utilizó la inmovilización covalente; sin embargo, también se ha descrito la inmovilización adsorptiva de colágeno I. En este caso, las muestras de titanio se remojaron en una solución de colágeno tipo I al 0,1% durante seis horas, se limpiaron con agua por ultrasonidos y finalmente se secaron al vacío (156). Ao y cols. evaluaron la inmovilización adsorptiva y covalente del colágeno tipo I en muestras de Ti-6Al-4V, con respecto a la adhesión, proliferación y diferenciación de HMC. Sus hallazgos sugieren que la inmovilización covalente es superior a la adsorptiva, tanto en la cantidad como en la estabilidad del colágeno tipo I.

Además, los estudios *in vivo* también han mostrado resultados satisfactorios. Morra y cols. investigaron el contacto hueso-implante de 8 implantes ColTi y ocho implantes Ti sin recubrimiento, en el hueso cortical del fémur y el hueso trabecular de la tibia de ocho conejos adultos (157). Dos semanas después de la

implantación, el contacto hueso-implante fue suficientemente mayor en los implantes ColTi que en los implantes Ti sin recubrimiento. Además, Sverzut y cols. implantaron doce implantes de titanio con superficie tratada con inmovilización covalente de colágeno tipo I, en las mandíbulas de seis perros mestizos (158). También se implantó otro grupo de doce implantes de titanio no tratados para utilizarlos como control. Los animales se sacrificaron tres y ocho semanas después de la implantación y se realizaron análisis histomorfométricos, celulares y moleculares. Los análisis histomorfométricos no mostraron signos de inflamación o formación de tejido fibroso adyacente a los implantes, mientras que el tratamiento de la superficie afectó claramente el contacto entre el hueso y el implante ($p < 0,001$). El análisis celular no mostró diferencias en el número de células osteoblásticas, pero hubo niveles más altos de fosfatasa alcalina adyacentes a los implantes ColTi. El análisis molecular indicó que el ARN que se extrajo del hueso adyacente a los implantes ColTi mostró una mayor expresión de genes que codificaron fosfatasa alcalina, factor de transcripción 2 relacionado con runt, osteocalcina y sialoproteína ósea. En otro estudio, Korn y cols. insertaron 36 implantes Cp-Ti de tipo tornillo en las mandíbulas de seis minipigs berlinesas femeninas (159). De los 36 implantes, 12 no estaban recubiertos, 12 se trataron en la superficie dando como resultado un recubrimiento de colágeno que contenía sulfato de condroitina y el resto, otros 12, se trataron en la superficie dando como resultado un recubrimiento de colágeno que contenía hialuronano sulfatado. Después de períodos de curación de cuatro y ocho semanas, la evaluación histológica indicó una mayor maduración ósea en los implantes recubiertos. Después del período de cicatrización de cuatro semanas, los implantes recubiertos de colágeno que contenían sulfato de condroitina tuvieron un contacto con hueso esponjoso superior (BIC esponjoso) en comparación con los implantes recubiertos

de colágeno sulfatado que contienen hialuronano ($p < 0,05$), mientras que después de ocho semanas de curación esta diferencia no fue estadísticamente significativa (159). Por último, pero no menos importante, Sartori y cols. compararon los implantes recubiertos de ColTi con los implantes de Ti no recubiertos en 20 ratas sanas y 20 osteopénicas. Los implantes estaban hechos de cp-Ti y recibieron un tratamiento de grabado con ácido fluorhídrico. El colágeno se inmovilizó covalentemente sobre las superficies del implante. Los implantes se implantaron en los cóndilos femorales de las ratas y se dejaron durante un período de curación que varió de cuatro a doce semanas. Cada rata recibió un implante de ColTi en el cóndilo derecho y un implante de Ti en el cóndilo izquierdo. La investigación histomorfométrica mostró que el contacto total entre el hueso y el implante fue significativamente mayor en los implantes ColTi, en comparación con los implantes Ti en los modelos de rata sana y osteopénica (160).

1.6.4. Modificación de la actividad biológica

1.6.4.1. Tecnología de autoensamblaje

La tecnología de autoensamblaje se refiere a una tecnología en la que las unidades estructurales básicas forman espontáneamente una estructura ordenada. La tecnología de autoensamblaje capa por capa (LBL) es un método para preparar una película multicapa de polielectrolito depositando alternativamente un sustrato cargado en una solución de polielectrolito con carga opuesta. Usando el método LBL, hialuronato de sodio y quitosano / pequeñas nanopartículas de ARN interferente se utilizaron como polianiones y policationes para construir una película multicapa sobre una superficie lisa de titanio. La superficie de titanio modificado puede promover significativamente la diferenciación de osteoblastos. Utilizando nanopartículas de plata, quitosano y ácido hialurónico como materias primas, se puede establecer un recubrimiento multicapa de lisozima, que puede

prevenir eficazmente las infecciones tempranas de los implantes. Yuan y cols. (161) prepararon una matriz de nanotubos de dióxido de titanio cargada con nanopartículas de plata sobre un sustrato de titanio, y luego depositaron una película multicapa bioactiva de quitosano y dialdehído de alginato en la matriz de nanotubos de dióxido de titanio cargada con plata utilizando la tecnología LBL en relación a la liberación de iones de plata, las muestras de LBL mostraron una actividad antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

1.6.4.2. Adsorción de biomoléculas

La adsorción se refiere al fenómeno de que la superficie del implante absorbe moléculas o iones en el medio circundante a través de fuerzas intermoleculares o enlaces químicos. Lin y cols. (162) encontraron que la unión covalente de quitosano, alginato de sodio y pectina a la superficie de la aleación de titanio Ti6Al4V puede promover la proliferación y diferenciación de osteoblastos. Chen y cols. (163) prepararon implantes de titanio poroso con superhidrofilicidad y superficie cargada negativamente mediante tratamiento térmico alcalino, que adsorbió recubrimientos de protamina / alginato / protamina cargados positivamente, y luego los aplicaron sobre la superficie del recubrimiento. Fijación de proteína morfogenética ósea exógena -2 para realizar la funcionalización biológica de la capa basal, se encontró que el recubrimiento de protamina / alginato / protamina adsorbido inhibía eficazmente la liberación de ráfaga inicial de la proteína adsorbida y logró una distribución uniforme de proteínas y una liberación sostenida de biomoléculas. En comparación con el titanio sin tratar, los que adsorben recubrimientos de protamina / alginato / protamina muestran una buena compatibilidad celular en la etapa inicial y pueden promover la adhesión celular. Los resultados de este estudio sugieren que la combinación de la modificación de la superficie

orgánica e inorgánica puede aumentar el potencial de osteointegración de los materiales de los implantes.

1.6.4.3. Recubrimiento antibacteriano

Se puede obtener un recubrimiento antibacteriano fijando una capa de sustancia antibacteriana sobre la superficie del implante mediante una combinación física o química. El estudio de Kazemzadeh-Narbat y cols. (164) mostró que la formación de una capa de péptido antimicrobiano catiónico combinado con HA en la superficie de titanio puede resistir la colonización de *Pseudomonas aeruginosa*. El propio quitosano tiene un efecto bactericida y puede utilizarse como recubrimiento liberador de fármacos. Algunos estudiosos cargaron hidroxipropiltrimetilamonio cloruro de quitosano en el proceso de preparación de nanotubos de dióxido de titanio por oxidación anódica. Experimentos in vitro demostraron que el recubrimiento de quitosano puede inhibir la adhesión de *Staphylococcus aureus*. Timofeeva y cols. (165) utilizaron un polímero cargado positivamente como tensioactivo, que interactúa con la superficie bacteriana cargada negativamente para destruir la pared celular bacteriana y la membrana celular, lo que lleva a la lisis celular bacteriana. Cui y cols. (166) injertaron fosfato de metacrilato de etilenglicol metacrilato en la superficie de la aleación de titanio Ti6Al4V y se cocultivaron con medio de cultivo de *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus mutans*; la tasa de cobertura se redujo considerablemente y se especuló que el recubrimiento podría reducir las infecciones relacionadas con bacterias. Además, en comparación con una superficie de aleación de titanio sin recubrimiento, una aleación de titanio cubierta con un recubrimiento de metacrilato-etilenglicol metacrilato fosfato tiene un mejor efecto osteogénico sobre los preosteoblastos MC3T3-E1.

Actualmente existen muchos métodos de modificación de superficies basados en materiales de implantes a base de titanio, todos los cuales tienen como objetivo mejorar el mosaico biológico entre el implante y el hueso y reducir la adhesión bacteriana en la superficie del implante de titanio. Cada tecnología de modificación de superficie tiene sus propias ventajas y desventajas, y aún es necesario desarrollar y optimizar más métodos de modificación de superficies para servir al tratamiento clínico.

1.6.4.4. Recubrimientos orgánicos antibióticos y no antibióticos

Se han incorporado antibióticos con amplios espectros antibacterianos, como gentamicina, cefalotina, carbenicilina, amoxicilina, cefamandol, metronidazol, simvastatina, tobramicina y vancomicina, en los recubrimientos de implantes óseos. El fosfato de calcio y la hidroxiapatita carbonatada se han utilizado en estudios in vitro como portadores de vancomicina y tobramicina para minimizar la adhesión bacteriana inicial. Estos estudios han demostrado que tanto el fosfato de calcio como la hidroxiapatita carbonatada cargados con antibióticos y utilizados como recubrimientos inhiben eficazmente el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Además, en un estudio in vitro, Liu y cols. integraron simvastatina y metronidazol en un revestimiento de fosfato de calcio sobre la superficie de titanio y descubrieron que este revestimiento evitaba el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

Además de estos recubrimientos, se han propuesto polímeros biodegradables y películas de gel como recubrimientos cargados de antibióticos de liberación controlada sobre superficies de titanio. Específicamente, Gollwitzer y cols. prepararon un recubrimiento biodegradable de poli (ácido D, L-láctico) con gentamicina y teicoplanina integradas en superficies de titanio y encontró una reducción estadísticamente

significativa en la adhesión bacteriana de *Staphylococcus epidermidis* en comparación con las aleaciones de titanio sin recubrimiento (167). En otros estudios, se prepararon recubrimientos biodegradables de poli (ácido láctico-co-glicólico) que contenían antibióticos mediante una técnica de electrohilado. El proceso de electrohilado se basa en la nanotecnología y produce nanofibras poliméricas que pueden utilizarse como agentes de administración de fármacos. Estos estudios demostraron que el recubrimiento electrohilado cargado con antibiótico sobre implantes de titanio redujo significativamente la adhesión de *Staphylococcus aureus* en comparación con los implantes de titanio desnudos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, el aumento de organismos microbianos resistentes a los antibióticos sigue siendo un problema considerable en la aplicación clínica de los fármacos. Además, algunos recubrimientos que contienen fármacos continúan liberando antibióticos en concentraciones bajas durante períodos de tiempo más prolongados, lo que aumenta el riesgo de resistencia a los antibióticos. Finalmente, existen estudios *in vitro* que registran que algunos antibióticos provocan toxicidad celular. Específicamente, Ince et al. mencionó que la disminución de la actividad osteoblástica puede atribuirse a la inhibición de la síntesis de proteínas provocada por la gentamicina en concentraciones superiores a $100 \mu\text{g} / \text{ml}$. Además, Antoci y cols. demostraron una reducción en la proliferación de osteoblastos después de la exposición de las células a ciprofloxacina, tobramicina y vancomicina, incluso a la dosis más baja de $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ de ciprofloxacina. Sin embargo, se requieren más estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar el efecto exacto de los antibióticos en las células humanas (168).

Con el aumento de organismos microbianos resistentes a varios antibióticos, se ha investigado la aplicación de agentes antimicrobianos orgánicos no antibióticos, como clorhexidina y cloroxilenol. La superficie de titanio tiene la capacidad de absorber

clorhexidina y liberarla gradualmente durante un largo período de tiempo. Sin embargo, varios estudios han demostrado que los agentes antimicrobianos orgánicos no antibióticos pueden afectar negativamente a los osteoblastos humanos. Específicamente, se especuló que la clorhexidina provoca la lisis de la membrana de los fibroblastos conduciendo a la muerte celular. Sin embargo, deben realizarse más investigaciones para extraer conclusiones definitivas sobre la biocompatibilidad de los agentes antimicrobianos no antibióticos.

Un enfoque alternativo para la prevención de la adhesión de bacterias es la modificación de las características de la superficie de los implantes. Los estudios in vitro han demostrado que el tratamiento con radiación ultravioleta (UV) de Ti-6Al-4V previene la colonización de bacterias. Además, algunos polímeros bioactivos, como el quitosano y el ácido hialurónico, unidos al titanio demostraron una mejor adhesión de los osteoblastos e inhibición de la adhesión bacteriana (169). Sin embargo, se desconoce el comportamiento in vivo de estas moléculas.

1.6.4.5. Recubrimientos antimicrobianos inorgánicos

Uno de los enfoques más prometedores y atractivos para la obtención de recubrimientos antibacterianos para el titanio es la incorporación de agentes antimicrobianos metálicos inorgánicos en la capa de óxido de titanio. La plata es un elemento metálico blanco, brillante y dúctil con número atómico 47 en la tabla periódica. La plata pura tiene la conductividad eléctrica y térmica más alta de todos los metales y posee la menor resistencia de contacto. El efecto antimicrobiano de la plata (Ag) se ha reconocido desde la antigüedad. Otras aplicaciones médicas de Ag como recubrimiento para la prevención de la formación de biopelículas incluyen la

incorporación en vendajes para heridas cutáneas, catéteres vasculares, urinarios y peritoneales, anillos de válvulas cardíacas protésicas, injertos vasculares y suturas.

La nanotecnología incluye campos de la ciencia y la tecnología y se basa en el desarrollo de materiales con dimensiones a nivel de nanoescala. La nanotecnología tiene una amplia gama de aplicaciones, como la medicina, la electrónica y la producción de biomateriales. Las nanopartículas son átomos o moléculas de entre 1 y 100 nanómetros de tamaño, con propiedades químicas y mecánicas mejoradas. Entre los diferentes tipos de nanomateriales, las nanopartículas de plata se consideran las más antimicrobianas contra bacterias y virus, debido a su gran relación superficie / volumen.

En cuanto al mecanismo antibacteriano de Ag, se desconoce la interacción exacta entre las nanopartículas de plata y las bacterias, por lo que existen muchas referencias que proponen varios mecanismos posibles. Se cree que Ag se une al ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano, disociando los enlaces de hidrógeno entre las bases de purina y pirimidina y, por lo tanto, evitando la replicación del ADN y la división celular. Otro posible mecanismo es la unión de la plata a las proteínas y enzimas de las células bacterianas, como los grupos sulfhidrilo, que conducen a la desnaturalización, la interrupción del metabolismo celular y, finalmente, la muerte. Se ha informado de que la unión extracelular de nanopartículas de Ag cargadas positivamente a peptidoglicanos cargados negativamente en las paredes de las bacterias es esencial para la actividad antimicrobiana de Ag que causa cambios estructurales y atrofia celular. Por último, Slawson y cols. creen que el mecanismo antimicrobiano de la plata radica en la liberación de iones Ag en la célula, lograda por un sistema de transporte de moléculas de carga y tamaño similares.

Estudios anteriores sugieren que las nanopartículas de Ag, incorporadas como revestimiento a las superficies de titanio, son inhibidores eficaces del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, evitando su adhesión o proliferación a estas superficies. Además, Jin y cols. (170) investigó el efecto antibacteriano del coimplante de zinc (Zn) y plata (Ag) en placas de titanio contra *S. aureus* y *E. coli* tanto in vitro como in vivo y encontraron una reducción en el crecimiento bacteriano en el titanio coimplantado con Zn / Ag. Otro estudio examinó la actividad antibacteriana de un recubrimiento biomimético enriquecido con nanopartículas de calcio (Ca), fósforo (P), silicio (Si) y plata (Ag) e incorporado en las superficies de titanio. Este estudio demostró una reducción significativa en la capacidad de supervivencia de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus epidermidis* y *Escherichia coli*. Sin embargo, debe mencionarse que las cepas examinadas anteriormente no son representativas de las bacterias orales que se encuentran en la enfermedad periimplantaria. Aunque no hay evidencia de la presencia de un número limitado de bacterias específicas en la periimplantitis, en general, la microbiota asociada con la enfermedad periimplantaria es similar a la flora subgingival de la periodontitis crónica y consiste en *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium sp.*, *Actinomyces*, *S. mutans*, *V. parvula*, *S. sanguinis* y *S. gordonii*. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de Ag incorporadas a las superficies de titanio contra estas bacterias periimplantarias no se ha investigado a fondo en la literatura. Massa y cols. examinaron el efecto antibacteriano de un recubrimiento compuesto a base de sílice que contiene nanopartículas de Ag en la superficie de titanio contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, aunque Mombelli y Décaillot encontraron que este

microorganismo es menos frecuente en las enfermedades periimplantarias que las bacterias antes mencionadas (171).

Además de la plata, también se han utilizado otros agentes antimicrobianos inorgánicos como el zinc (Zn), el cobre (Cu) y el flúor (F) como revestimientos antibacterianos para implantes de titanio. Sin embargo, la plata es preferible, debido a su amplio espectro antibacteriano tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas, su efecto antibacteriano duradero, su biocompatibilidad y su estabilidad. Estudios anteriores han examinado el efecto antimicrobiano del zinc. Sin embargo, la reducción del crecimiento de bacterias lograda por el zinc no fue duradera. Li y cols. prepararon recubrimientos que contenían nanotubos de titanio (Ti) y zinc (Zn) en láminas de titanio y encontraron prevención de la colonización bacteriana durante dos semanas (172). Sin embargo, se encontró que esta acción antibacteriana disminuyó con el tiempo. Además, existe evidencia de que la incorporación de cobre (Cu) en las aleaciones de titanio aumenta su efecto antimicrobiano. Sin embargo, cabe mencionar que la implantación de iones de cobre compromete las propiedades mecánicas de los metales reduciendo su resistencia a la corrosión y al desgaste. El titanio y sus aleaciones son un biomaterial muy prometedor para la fabricación de implantes médicos y dentales, debido a sus excelentes propiedades mecánicas y biocompatibilidad. La introducción de β -estabilizadores de fase y vidrios metálicos a granel en las aleaciones de Ti ha permitido el desarrollo de nuevas aleaciones con alta resistencia mecánica y bajo módulo de elasticidad que permiten una carga adecuada del hueso. Además, la alta resistencia a la corrosión y biocompatibilidad de estas nuevas aleaciones limitará fallas como fracturas por fatiga, aflojamiento del implante y reacciones adversas debido a la liberación de iones. Además, las superficies porosas y los recubrimientos de implantes bioactivos parecen mejorar la bioactividad de

los implantes y conducir a una osteointegración más rápida y mejorada. Además, los recubrimientos superficiales con efectos antimicrobianos son muy prometedores para limitar los fallos debidos a infecciones.

Aunque se ha avanzado mucho, parece que aún quedan muchas mejoras por lograr. Los métodos de fabricación y sus parámetros parecen jugar un papel fundamental en las propiedades mecánicas, la resistencia a la corrosión, el tamaño de los poros y la distribución de los materiales. Las interacciones celulares con las superficies de implantes modificadas deben entenderse completamente a nivel nanométrico, para fabricar implantes con altas tasas de osteointegración y fuertes efectos antibacterianos. Los hallazgos de la literatura actual son muy prometedores, pero todavía hay margen de mejora para los implantes que proporcionarán una mejor calidad de vida tanto a los pacientes médicos como dentales.

1.7. Plasma de argón

Actualmente, se investiga para mejorar el logro de la osteointegración de los implantes con el objetivo de ampliar el rango de aplicación de materiales biocompatibles con los tejidos óseos (174). Vandrocova y cols. informan que los materiales dentales de superficie controlada tienen un efecto significativo en la adhesión celular inicial y la diferenciación ósea. Las células mesenquimales indiferenciadas presentes en el tejido que rodea a un implante se conocen como células dependientes de andamios. La osteointegración de los implantes depende de las propiedades de la superficie, como la morfología y la composición química de los diversos materiales que sirven como andamios para las células mesenquimales indiferenciadas. El titanio es el principal material utilizado para la fabricación de los implantes, es un biomaterial que no se une

directamente a la cavidad del implante; sin embargo, es bioactivo debido a la modificación de la estructura superficial y puede regular la formación de hueso en la interfaz del cuerpo del implante óseo.

En los últimos años, se ha comprobado que la humectabilidad de la superficie afecta la dinámica de los osteoblastos y, por consiguiente, la osteointegración; además, los implantes que exhiben hidrofilia ya están disponibles en el mercado. Se han realizado muchos estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la relación entre la hidrofilia y la adhesión celular, otros sobre la correlación entre la humectabilidad de la superficie del material y diferentes tipos de células. En general, la forma de la superficie juega un papel importante en la diferenciación y morfología celular, los cambios en las propiedades de la superficie son cruciales para la adhesión inicial de las proteínas involucradas en los procesos celulares y la osteointegración. Existen tres métodos de modificación química superficial para impartir hidrofilia a la superficie de un material: 1) método de tratamiento con plasma a presión atmosférica, 2) método de irradiación ultravioleta, 3) método de inmersión en solución de peróxido de hidrógeno. El método de plasma a presión atmosférica es un método para crear un estado ionizado a baja temperatura; siendo posible controlar la energía superficial introduciendo un grupo funcional en la misma. Por lo tanto, el alcance de la aplicación del método de plasma a presión atmosférica a los biomateriales se está expandiendo. El método de irradiación UV aumenta la hidrofilia de la superficie de titanio debido al efecto fotocatalítico del óxido de titanio y es eficaz para la proliferación y diferenciación de osteoblastos.

Al aplicar el tratamiento UV y el tratamiento con plasma a presión atmosférica a una superficie de titanio, se puede reducir el contenido de carbono en la superficie del

material, esto aumenta la hidrofilia de la superficie sin cambiar la estructura de la misma. También demostraron que la superficie de este material inducía la adsorción de proteínas, la adhesión temprana celular y la inducción de la diferenciación de las células de la médula ósea, así como la formación de hueso nuevo en los tejidos que rodean al implante. Además, en la evaluación utilizaron el sistema microbalanza de cristal de cuarzo (MCQ), como resultado de cada tratamiento de la superficie metálica de titanio puro, ello informó que la tasa de adhesión de proteínas y células de la médula ósea fue mayor en el grupo de tratamiento con plasma a presión atmosférica que de tratamiento con UV.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la superficie del material son menores en el grupo de tratamiento con plasma y se considera que se establece un entorno deseable para el crecimiento celular. Las ROS activan la diferenciación de los osteoclastos y la apoptosis de los osteocitos e inhiben la actividad de los osteoblastos induciendo la resorción ósea; los antioxidantes activan la diferenciación de osteoblastos e inhiben la actividad de osteoclastos y la apoptosis de osteocitos induciendo la formación de hueso. El tratamiento UV y el tratamiento con plasma de superficies de titanio con nanoestructuras, y los cambios en la estructura superficial de las nanoestructuras y en la textura superficial inducida por cada tratamiento son interdependientes, lo que resulta en una alta dureza. Los datos indican que podría inducir la diferenciación de tejidos y tener propiedades antibacterianas. Además, logramos aumentar la hidrofiliidad de la superficie del material mediante la realización de un tratamiento UV y un tratamiento con plasma en nanocirconio, que está atrayendo mucha atención como material de implante para pacientes alérgicos a los metales. Sin embargo, es difícil mantener el estado hidrofílico de la superficie del material y, por lo tanto, se requieren mejoras adicionales.

El tratamiento con plasma a presión atmosférica a baja temperatura que crea un estado ionizado es un método que puede controlar las propiedades de la superficie, como la energía superficial y la carga superficial modificando un grupo funcional en la superficie además del efecto de limpieza en la superficie del material. Por ello, su ámbito de aplicación a los biomateriales se está ampliando. Entre estos, el tratamiento con plasma realizado en presencia de argón también se denomina tratamiento con plasma de argón de descompresión, y posiblemente se pueda usar ampliamente como un método de tratamiento de superficie para materiales de implante. El metal de titanio puro se somete a tratamiento con plasma en un entorno mediado por oxígeno o argón para mejorar aún más la hidrofilia y mejorar la adhesividad inicial y las características de diferenciación de varias células. En este estudio de Satoshi Komasa y cols. se utilizó un cepillo piezoeléctrico como dispositivo de plasma. La mayoría de los dispositivos de plasma consisten en máquinas grandes, y existen muchos inconvenientes asumiendo que van a ser utilizados por odontólogos clínicos. Por el contrario, el aparato de plasma utilizado en este estudio es comparativamente pequeño y fácil de usar. El cepillo piezoeléctrico es un dispositivo que cambia la boquilla del dispositivo y permite el procesamiento de plasma en varios entornos gaseosos. Es decir, es posible tratar una superficie de titanio mediante un tratamiento con plasma de argón de descompresión, y se espera que esto cree un nuevo material con el objetivo de mejorar aún más la biocompatibilidad. El cepillo piezoeléctrico utilizado en este experimento es un dispositivo de plasma de tipo práctico, que es útil como dispositivo utilizado por dentistas clínicos. Esta vez, se puede conectar una boquilla multigas a este dispositivo de plasma y es posible usar gas juntos. El uso de gas argón aumenta significativamente la formación prematura de hueso periimplantario,

Se ha descrito que el tratamiento con plasma descontamina de manera efectiva las superficies, sin afectar su microtopografía compleja. De hecho, aunque esta tecnología se desarrolló originalmente para descontaminar superficies planas en la industria de la microelectrónica, la limpieza con plasma se introdujo recientemente en la implantología dental para limpiar los pilares de los implantes y activar las superficies de los implantes para la unión celular. De hecho, se demostró que el plasma no térmico, que se puede producir a presión atmosférica o al vacío, preserva la integridad de los materiales, eliminando cualquier posible residuo orgánico. Esta tecnología (presión, energía, tipo de gas), también es capaz de aumentar la energía superficial. Desde un punto de vista fisicoquímico, los electrones e iones acelerados dentro del plasma pueden hacer que las superficies sean hidrófilas, lo que aumenta la capacidad del óxido de titanio. capa para interactuar con las proteínas y las células. Además, se demostró que este tratamiento es capaz de mejorar la adhesión del tejido y apoyar aún más la propagación de los osteoblastos. La tecnología de plasma no térmico también está disponible para uso intraoral, produciendo plasma a presión atmosférica. De esta forma, el plasma representa un gas frío ionizado eléctricamente neutro compuesto de iones, electrones, partículas neutras, radicales libres y partículas neutras químicamente reactivas. Al mismo tiempo, cuando se usa oxígeno como gas, en combinación con el cepillado, podía destruir y eliminar los biofilms bacterianos. Esto podría ser muy prometedor para tratar la periimplantitis y mejorar la capacidad de reoseintegración. Este estudio in vitro fue para probar los efectos de la descarga de la barrera dieléctrica a presión atmosférica de argón en tres superficies de implante diferentes con respecto a la descontaminación bacteriana y la adhesión de osteoblastos.

La evaluación con microscopio electrónico de barrido no mostró cambios estructurales en la superficie del material debido al plasma a base de argón y al tratamiento con plasma.

El tratamiento superficial con plasma de argón se utiliza ampliamente como último paso del proceso de fabricación de los dispositivos de implantes de titanio antes de su esterilización por rayos gamma. Esta tecnología funciona mediante la activación del manto electrónico de materiales mediante una pulverización de argón a presión a temperatura ambiente. El principal efecto microscópico de dicha activación es la eliminación de la contaminación microbiológica y la contaminación de las superficies metálicas. Al mismo tiempo, este proceso también es capaz de modificar las características fisicoquímicas y, a su vez, biológicas de las superficies de los implantes y su interacción con el medio ambiente (174).

La posibilidad de utilizar una tecnología de este tipo fuera del campo industrial en la práctica clínica diaria es particularmente fascinante. En particular, la activación de componentes de implantes protésicos de titanio antes de su instalación en la cavidad bucal podría representar un campo de aplicación muy ventajoso del tratamiento con plasma de argón. Estudios recientes, en este sentido, han sugerido que el tratamiento de pilares de titanio con plasma de argón puede mejorar la cicatrización del tejido blando periimplantario en una etapa temprana. Se asoció con la preservación del nivel del hueso marginal a lo largo del tiempo.

En el estudio de Marco Annunziata y cols. se evaluaron los efectos del tratamiento con plasma de argón en diferentes superficies de implantes de titanio (torneadas, pulidas

con chorro de arena / grabadas con ácido y pulverizadas con plasma de titanio previamente expuestas *in vitro* a contaminación bacteriana.

Los datos del presente estudio *in vitro* demostraron que el plasma de argón es adecuado para eliminar cualquier rastro de contaminación bacteriana en discos de titanio previamente contaminados con diferente micro-topografía.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans se utilizó como microorganismo de prueba debido a su presencia en la cavidad oral humana y en la biopelícula subgingival. Este microorganismo, de hecho, es un bastoncillo inmóvil facultativo gramnegativo que se encuentra a menudo asociado con la periodontitis, especialmente en sus formas más agresivas. Al mismo tiempo, se ha demostrado que *A. actinomycetemcomitans* también tiene un papel en la enfermedad periimplantaria, junto con bacterias anaerobias gramnegativas comúnmente asociadas a periodontitis crónica (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium* sp., *Prevotella intermedia*) y microorganismos asociados a periodontitis resistente al tratamiento (refractaria) (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*).

En el presente estudio, el análisis microbiológico de los discos de titanio previamente contaminados por Aa durante 24 horas y no tratados por la cámara de plasma de argón (grupo control), demostró la adhesión bacteriana a todo tipo de superficies: torneadas, pulidas con chorro de arena / grabadas con ácido y con plasma de titanio pulverizado. En particular, se observó una tendencia a una adhesión bacteriana ligeramente mayor en superficies más rugosas, pero no se detectó significación estadística. Este hallazgo no concuerda con la parte principal de la literatura, en la que

generalmente se informa de una correlación directa entre la adhesión bacteriana y la rugosidad de la superficie de los implantes de titanio. Sin embargo, se sabe cómo dicha correlación se basa en estudios en gran medida descriptivos y numerosas variables pueden afectar potencialmente los resultados obtenidos y dificultar la comparación de diferentes estudios, incluidos los tratamientos superficiales específicos aplicados y la ausencia de un sistema de clasificación universalmente aceptado para las características de la superficie del implante.

Según los datos reportados, un ciclo de 12 minutos en la cámara de plasma de argón permitió eliminar cualquier rastro de bacterias de las tres superficies adoptadas en el estudio, independientemente de su diferente rugosidad superficial. Esto está de acuerdo con el estudio de Yu y cols. quienes demostraron que el plasma de argón es efectivo en la inactivación / esterilización de superficies de bacterias orales, y Youngblood y cols., quienes sugirieron el uso de descarga de plasma brillante como un procedimiento de esterilización alternativo para implantes médicos y dentales.

En realidad, el término "esterilización" se refiere a cualquier proceso que elimina todos los microorganismos, incluidas bacterias, esporas, hongos, virus y priones. Aunque se dispone de pocos datos sobre su efecto sobre los priones, que siguen siendo el desafío más difícil para cualquier procedimiento de esterilización médica, varios estudios han demostrado la capacidad de los plasmas atmosféricos fríos para promover la descontaminación de objetos inanimados, gracias a su alta eficacia antimicrobiana y su fácil acceso a espacios estrechos y confinados.

El posible mecanismo subyacente al efecto antibacteriano del plasma de argón atmosférico no térmico a baja temperatura se ha estudiado ampliamente durante la última

década. Se concluyó que la inactivación eficaz de microorganismos se basa en agentes altamente reactivos generados por plasma, incluidos fotones UV, especies de oxígeno, partículas cargadas y campos eléctricos.

Los datos reportados sugirieron que la tecnología de plasma de argón podría usarse de manera eficiente para descontaminar / esterilizar superficies de implantes de titanio previamente infectadas. Estos resultados alentadores amplían potencialmente el uso de esta tecnología también para la descontaminación de superficies de implantes rugosas infectadas, con el objetivo de afectar positivamente la respuesta de los tejidos periimplantarios blandos y duros. Podría abrirse a nuevas estrategias posibles en el campo de la terapia de la periimplantitis una vez que esté disponible una pieza de mano específica para uso en el sillón.

La rehabilitación oral con implantes dentales es un procedimiento habitual en la actualidad, y el titanio es el principal elemento del que se componen. Existen diferentes grados de titanio en los que hay un aumento de los elementos Fe, O y N a medida que aumenta el grado. El titanio Grado IV es el más utilizado en la fabricación de implantes, pero también se han realizado diferentes aleaciones de titanio con otros elementos (aluminio y vanadio) para conseguir el titanio Grado V (Ti6Al4V) con el que se obtienen mejores propiedades mecánicas.

Se pueden aplicar varios tratamientos a la superficie del titanio para mejorar sus propiedades osteoconductoras agregando o restando material y limpiando o eliminando la capa superficial nativa. Algunos ejemplos de técnicas anteriores son la pulverización de plasma, el pulido con chorro de arena o el grabado ácido. La combinación de estas dos últimas técnicas conduce a superficies pulidas con chorro de arena, grabadas con ácido

(SLA), que proporcionan cambios topográficos a nivel macro y microscópico con un tamaño medio de poro de 1 a 3 μm . Esta técnica es muy utilizada debido a la mejora en la unión de la superficie del implante con las células osteoblásticas, factor clave en la osteointegración del titanio.

Una vez fresada y tratada la superficie del implante, un paso adicional que se puede realizar es la descontaminación de la superficie del implante antes de esterilizar con rayos gamma.

La contaminación superficial es inevitable y se atribuye a elementos orgánicos como el carbono e impurezas del proceso de fabricación del implante que se depositan en su superficie. Se pueden aplicar diferentes tipos de tratamientos con plasma frío, como oxígeno, argón o helio. En nuestro estudio se utilizó una cámara de argón. Funciona activando el recubrimiento electrónico de materiales mediante un tratamiento con plasma al vacío a base de argón. El principal efecto de la activación mencionada es la eliminación de la contaminación orgánica y la contaminación de la fabricación. Al mismo tiempo, este proceso también puede modificar la química de la superficie y, a su vez, las características biológicas de las superficies del implante y su interacción con el medio ambiente. Este procedimiento puede llevarse a cabo ya que se ha observado que los restos de carbono pueden limitar la interacción célula-implante, lo que resulta en una menor unión implante hueso (BIC).

Varios autores han informado de las ventajas de esta técnica cuando se aplica durante unos minutos antes de la utilización del material del implante. Esta técnica también produjo una mejor adhesión celular y adsorción de proteínas en estudios *in vitro*.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En base a la evidencia científica publicada y a los datos empíricos publicados hasta la fecha, nuestra hipótesis principal de trabajo fue:

La proliferación celular, la morfología de las células y el balance energético mitocondrial de las células MG-63 adheridas a los diferentes tipos de superficies utilizadas en nuestro estudio in vitro, como son los discos de titanio grado IV y grado V va a ser mayor y más favorecedoras al tratar las mismas con plasma de argón.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- **General:**

El objetivo de este estudio fue analizar y comparar la cantidad y calidad de las células MG-63 sembradas en discos de titanio grado IV y V que fueron tratados (o no tratados) con plasma de argón no térmico.

- **Específicos:**

1. Determinar el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la viabilidad del control (100%) después de seis horas, 24 horas y 48 horas en los cuatro tipos de superficies estudiadas.
2. Evaluar el área y circularidad de las células en las cuatro superficies analizadas.
3. Valorar el balance de energía mitocondrial en las cuatro superficies estudiadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio *in vitro* se llevó a cabo en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

4.1. Justificación de la elección de la célula MG-63 como modelo experimental

Los osteoblastos establecidos, como las líneas celulares, son modelos útiles para estudiar el efecto de los fitoquímicos (este término es utilizado para describir compuestos de plantas que están bajo investigación por efectos en la salud). Entre los diversos tipos de células, las células MG-63 se han utilizado ampliamente como modelo experimental para estudiar una variedad de funciones diferentes, como la adhesión, la síntesis de matriz extracelular (MEC), la actividad de la fosfatasa alcalina, etc., ya que la función de las células MG-63 se asemeja a la de las células osteoblásticas humanas (175).

Las fracciones fitoquímicas se eligen para determinar la concentración de dosificación para el crecimiento y proliferación de células MG-63.

4.2. Preparación de la muestra

Se estudia el crecimiento de las células osteoblásticas en diferentes discos de titanio grado IV y V (tratadas y no tratadas, con 8 mm de ancho, 2 mm de alto).

Se utilizaron cuatro tipos diferentes de discos: discos de titanio de grado IV con tratamiento con SLA y sin tratamiento con plasma de argón (GR4NT); Discos de titanio de grado IV tratados con SLA y plasma de argón (GR4TR); Discos de titanio de grado V tratados con SLA, pero no tratados con plasma de argón (GR5NT) y discos de grado V con SLA y plasma de argón (GR5TR). Además, como elemento que asegure el daño celular, se utiliza la xantina oxidasa.

El tratamiento con SLA (arenado con grano grande y grabado al ácido) se basó en partículas de silicio de grano grueso (250 a 500 μm) granalladas después de un tratamiento de grabado ácido utilizando una mezcla de ácidos clorhídrico y sulfúrico sobre las superficies de titanio, obteniendo una rugosidad superficial (R_a) de $1,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$.

Se realizó un tratamiento con plasma frío al vacío utilizando un reactor de plasma V15-G producido por Plasma Finish y otro sistema de plasma de baja presión V15-G, PINK, Alemania.



Figura 2. Reactor de plasma V15-G.

Dentro de las principales características del reactor de plasma V15-G producido por Plasma Finish, se enumeran:

- Caja tipo de grabador
- Potencia nominal de salida 300 vatios
- Centro de reactor rectangular
- Tamaño del centro del reactor: ancho 24,77 cm, profundidad 24,77 cm, altura 24,77 cm
- Material del centro del reactor: aluminio
- Número de entradas de gas: gas único
- Bomba de vacío no incluida
- Medidores de panel digital
- Refrigeración externa: refrigerada por aire

Cuando se trata con plasma a baja presión, el material a tratar se calienta muy poco, ya que el gas tiene una temperatura muy baja.

Sistema de plasma de baja presión V15-G es un sistema estándar para activar, limpiar, recubrir y grabar.



Figura 3. Sistema de baja presión dentro de V15-G.

Las características del sistema de baja presión V15-G por PINK, son:

- Tipo de planta: gabinete de 19"
- Dimensiones de la cámara: ancho 25 cm, profundidad 25 cm, altura 25 cm
- Potencia del microondas: 100-600W
- Entradas de gas con control de caudal másico 1
- Conexión eléctrica 230/400 V, 50/60 Hz
- Carga conectada (sin bomba): 1,5 kVA
- Dimensiones del sistema: ancho 67 cm, profundidad 90 cm, altura 18,5 cm

4.3. Desinfección de discos

Antes realizar el cultivo celular, se realiza la desinfección de los discos de titanio con rayos ultravioleta

4.4. Cultivo de células

La línea celular MG-63 se usó en este estudio porque puede retener el fenotipo diferenciado en subcultivos consecutivos y muestra un crecimiento más rápido que las líneas primarias formadoras de hueso, lo que la convierte en un buen modelo in vitro. Las células MG-63, son una línea derivada de un osteosarcoma, que producen altos rendimientos de interferón después de la superinducción con ácido poliinosínico · ácido policitidílico, cicloheximida y actinomicina D. Las ventajas de las células MG-63 sobre los fibroblastos diploides como sustrato son: no se requieren para el envejecimiento entre confluencia e inducción, sin necesidad de cebado y rendimientos 3,7 veces superiores por centímetro cuadrado de superficie de cultivo. Desde el punto de vista fisicoquímico y biológico, el interferón de células MG-63 se parece más a los fibroblastos que al interferón leucocitario (176).

Se cultivaron células MG-63 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) en matraces de cultivo T75 con medio Eagle modificado de Dulbecco (Biowest, Nuaille, Francia) enriquecido con un Antibiótico al 1% (glutamina-penicilina-estreptomicina [Biowest, Nuaille, Francia]) y suero bovino fetal al 10% (Biowest).



Figura 4. Matraz de cultivo T75 en forma de U.

Después de realizar dos subcultivos de células y lograr una confluencia del 80%, las células se sembraron en las superficies del disco en una placa de 24 micropocillos a una concentración previamente calculada de 2×10^4 células.

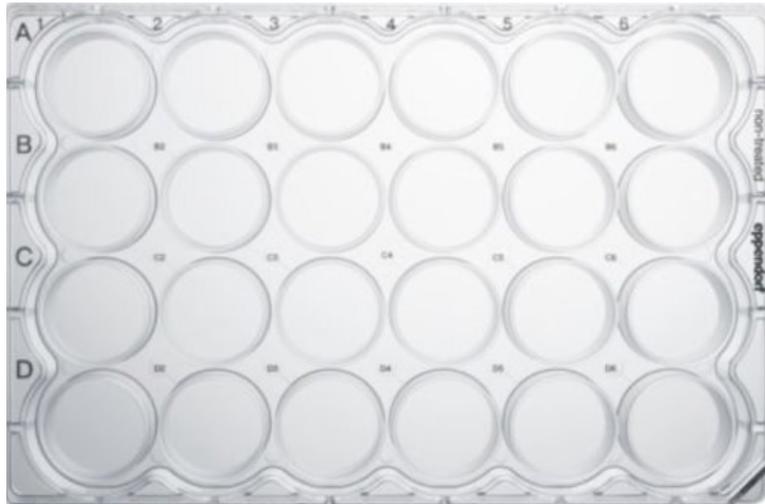


Figura 5. Placa de 24 micropocillos.

Se emplearon tres discos para cada tipo de superficie y los experimentos se triplicaron. Se utilizaron micropocillos sin discos como controles positivos. Después de 4 h de incubación, el cultivo celular se controló mediante un microscopio de contraste de fase Olympus CKX41SF2 (Olympus, Shinjuku-ku, Tokio, Japón).



Figura 6. Microscopio de contraste de fase Olympus.

El microscopio de contraste de fase Olympus presenta las siguientes características:

- El CKX31 y el CKX41 fueron diseñados utilizando el sistema óptico corregido al infinito (UIS)
- Funcionamiento óptico mejorado para contraste de fase y nuevo contraste de relieve
- El deslizador precentrado ahorra tiempo en la configuración del anillo de fase
- El nuevo tubo de observación inclinable ofrece posicionamiento ergonómico para realizar observaciones sentado o de pie (opcional sólo en el CKX41)
- La potente bombilla halógena de 6V/30W proporciona una calidad y un brillo de imagen excepcionales para la observación de células
- La identificación en las platinas de vidrio facilita el reconocimiento de los objetivos (opcional sólo con el CKX41)
- Anillo de fase común sin centralización para 10x, 20x y 40x; no existe necesidad de ajustarlo (estándar con el CKX31)

Luego, los micropocillos se llenaron completamente con medio Eagle modificado de Dulbecco y se incubaron durante un período de 24 h.

4.5. Análisis de viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular a las seis horas, 24 horas y 48 horas, en los cuatro tipos de superficies (GR4NT, GR4TR, GR5NT y GR5TR), por triplicado, para así determinar la proliferación celular. Se utilizó el ensayo WST-1 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), el WST-1 es un ensayo citotóxico celular sensible y fiable para la citotoxicidad celular y la proliferación. El principio del ensayo se basa en la reducción de la sal de tetracilio WST-1 a formazan por deshidrogenasas celulares.

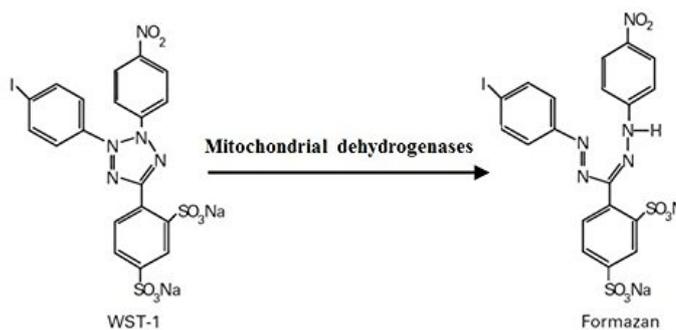


Figura 7. Acción de la enzima deshidrogenasas: WST-1 a Formazan.

Este ensayo se utiliza tanto en los pocillos de muestra como en los de control. Como elemento que asegure el daño celular y control negativo del estudio, se utilizó xantina oxidasa (XO, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). La xantina oxidasa es una enzima que, al entrar en contacto con las células, libera radicales libres y, por lo tanto, reduce la intensidad de fluorescencia emitida por las células en espectrofotometría. Se le dio un valor de 100% de viabilidad al control negativo (células sembradas en pocillos sin discos), y se obtuvieron los valores de viabilidad de las muestras como porcentaje de este valor.

4.6. Análisis morfológico y balance energético mitocondrial

Para el análisis morfológico celular y la determinación del balance energético mitocondrial de las células adheridas a los discos, se cultivaron osteoblastos en los discos de los cuatro tipos de superficies analizadas (GR4NT, GR4TR, GR5NT y GR5TR), por triplicado.

Después de un período de incubación de 24 horas, se realizó la tinción celular con Phalloidin-tetramethylrhodamine (TRITC) (Sigma, Darmstadt, Alemania), que proporciona una tinción de alta afinidad de la F-actina del citoesqueleto celular,

totalmente compatible con otras tinciones fluorescentes. Se utilizó DAPI (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN, para teñir los núcleos. Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Jena, Alemania) con 40 aumentos.

Se utilizaron cinco discos para cada grupo.

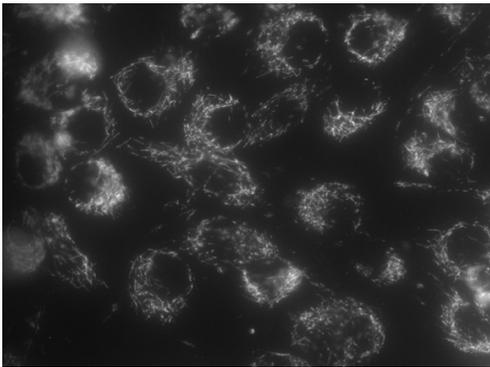


Figura 8. GR4NT.

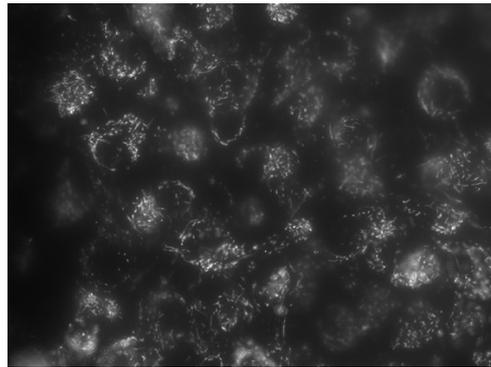


Figura 9. GR4TR.

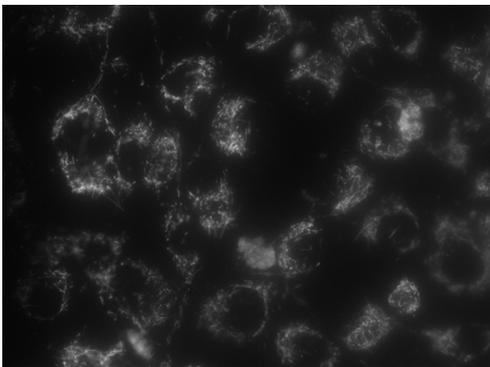


Figura 10. GR5NT.

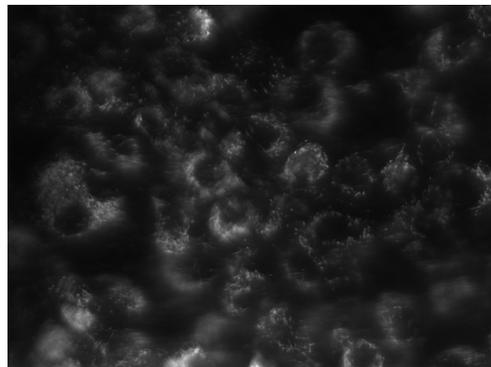


Figura 11. GR5TR.

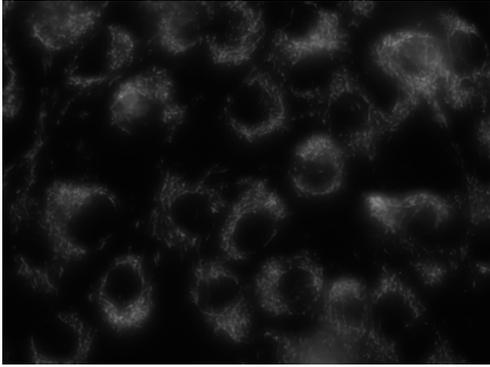


Figura 12. Grupo de control negativo.

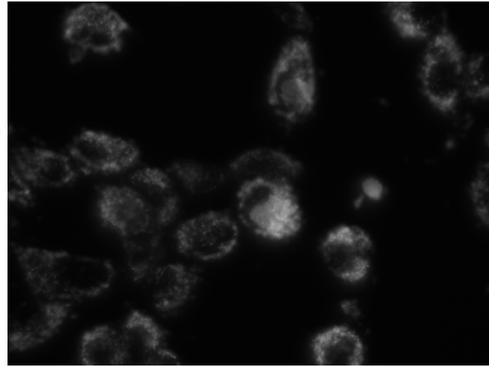


Figura 13. Grupo de control positivo por xantina Oxidasa.



Figura 14 y 15. Imagen del microscopio Axio Imager.

El Axio Imager de Carl Zeiss presenta un óptimo contraste y resolución. Se caracteriza por tener una torreta de objetivo de 7 posiciones que permiten el uso de objetivos de 1,25X a 100X para un rango de aumento total de 12,5X a 1000X en los oculares, sin necesidad de quitar y cambiar los objetivos en la torreta.

Asimismo, las medidas del tamaño de las células se tomaron con ImageJ v1.50e (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.), ImageJ es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado

en Java desarrollado en el National Institutes of Health. ImageJ fue diseñado con una arquitectura abierta que proporciona extensibilidad vía plugins Java y macros (macroinstrucciones) grabables. Se pueden desarrollar plugins de escaneo personalizado, análisis y procesamiento usando el editor incluido en ImageJ y un compilador Java. Los plug-ins escritos por usuarios hacen posible resolver muchos problemas de procesamiento y análisis de imágenes, desde imágenes en vivo de las células en tres dimensiones, procesamiento de imágenes radiológicas, comparaciones de múltiples datos de sistema de imagen hasta sistemas automáticos de hematología.

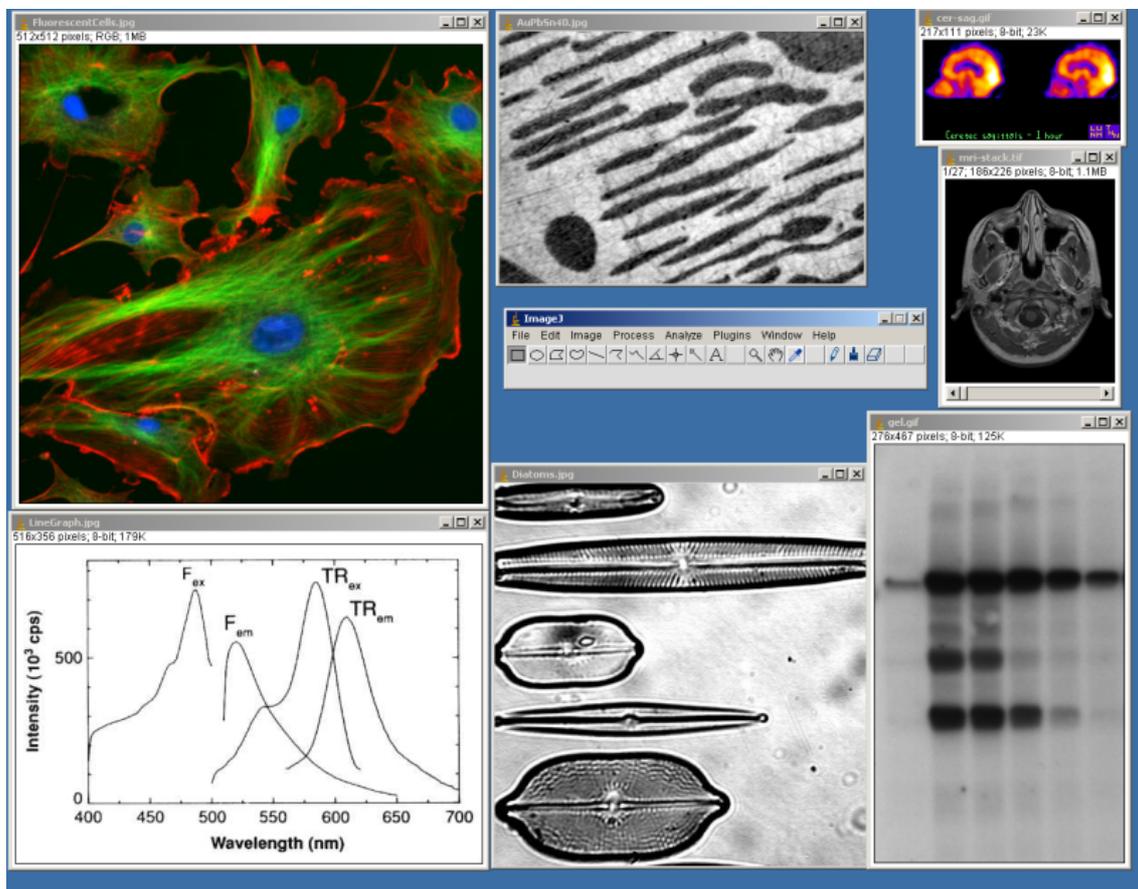


Figura 16. Programa de procesamiento de imagen digital ImageJ

La herramienta de segmentación se utilizó para detectar las formas de las células automáticamente, medir el área y la circularidad. Este último parámetro es adimensional

y se basa en la relación entre el área de la célula y el cuadrado de su perímetro normalizada con respecto a $1/4\pi$, de manera que la circularidad de un círculo es 1.

Finalmente, para evaluar el balance energético mitocondrial de las células MG-63, se tomaron microfotografías después de la tinción de cultivo con JC-1 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). A bajas concentraciones, este tinte forma monómeros con fluorescencia verde; a concentraciones más altas, forma agregados con una emisión roja. Esta relación rojo / verde revela el potencial de membrana. Se tomaron imágenes con el microscopio de fluorescencia Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Jena, Alemania) y se midió la relación rojo / verde con el citómetro FC500MPL (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.), éste citómetro de flujo Cytomics FC 500 es una adquisición automatizada basada en tubos para ensayos clínicos, tiene la capacidad de realizar análisis de 5 colores utilizando un solo láser de 488 nm (azul) o un láser dual de 488 nm/635 nm (azul/rojo). El FC500 está disponible con un cargador de tubos de carrusel o un cargador multiplataforma (MPL) que acomoda tanto tubos como placas.



Figura 17. Citómetro FC500MPL.

4.7. Análisis estadístico

La comparación de los grupos (Tabla 5) para cada una de las variables analizadas se realizó mediante el software IBM SPSS Statistics 24.0 (International Business Machines Corp., Nueva York, NY, EE. UU.), este software está diseñado para resolver problemas comerciales y de investigación mediante análisis ad hoc, prueba de hipótesis, análisis geoespacial y análisis predictivo. Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución normal, es una prueba no paramétrica que determina la bondad de ajuste de dos distribuciones de probabilidad entre sí. La igualdad de varianzas de homogeneidad se verificó mediante la prueba de Levene. Se calculó el análisis de varianzas unidireccional (ANOVA). Se aplicó la prueba de Bonferroni para comparar los grupos. Se estableció un nivel de significancia estadística del 5% ($p < 0.05$).

Tabla 5. Variables independientes para los diferentes grupos de trabajo.

VARIABLES INDEPENDIENTES	SIN TRATAMIENTO	TRATADO CON PLASMA DE ARGÓN
<i>TITANIO GRADO 4</i>	GR4NT	GR4TR
<i>TITANIO GRADO 5</i>	GR5NT	GR5TR

Tabla 6. Variables dependientes.

COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO	DIMENSIÓN	UNIDADES
VIABILIDAD CELULAR	PORCENTAJE DE CÉLULAS VITALES CON RELACIÓN AL CONTROL	%
MORFOLOGÍA CELULAR	ÁREA CELULAR	μM^2
	CIRCULARIDAD DE LA CÉLULA ⁽¹⁾	SIN MEDIDA
ACTIVIDAD CELULAR	BALANCE ENERGÉTICO MITOCONDRIAL ⁽²⁾	SIN MEDIDA

- (1) La circularidad es adimensional y se basa en la relación entre el área de la célula y el cuadrado de su perímetro normalizada con respecto a $1/4\pi$, de manera que la circularidad de un círculo es 1.
- (2) Coeficiente entre células activas e inactivas, marcadas con JC1.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Viabilidad celular

Se calculó el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la viabilidad del control (100%) después de seis horas, 24 horas y 48 horas en los cuatro tipos de superficies, titanio grado IV no tratado, titanio grado IV tratado, titanio grado V no tratado y titanio grado V tratado. Se obtuvieron los siguientes datos, expuestos en la Tabla 7.

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad celular respecto a la viabilidad del control (100%) en las distintas superficies analizadas según los intervalos de tiempo establecidos.

Muestra	Titanio IV (GR4NT)	Titanio IV (GR4TR)	Titanio V (GR5NT)	Titanio V (GR5TR)
6 horas	38.7 ± 2.5% ab	79.8 ± 15.2% a	53.3 ± 4.0%	87.6 ± 6.3% b
24 horas	47.3 ± 8.1% ab	79.1 ± 1.1% a	77.0 ± 11.0% c	91.3 ± 3.0% bc
48 horas	86.0 ± 19.3%	77.2 ± 2.5%	93.0 ± 5.2%	105.4 ± 3.5%

Nota: En la misma fila, los pares de letras idénticas (a-a, b-b, ...) Identifican valores con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

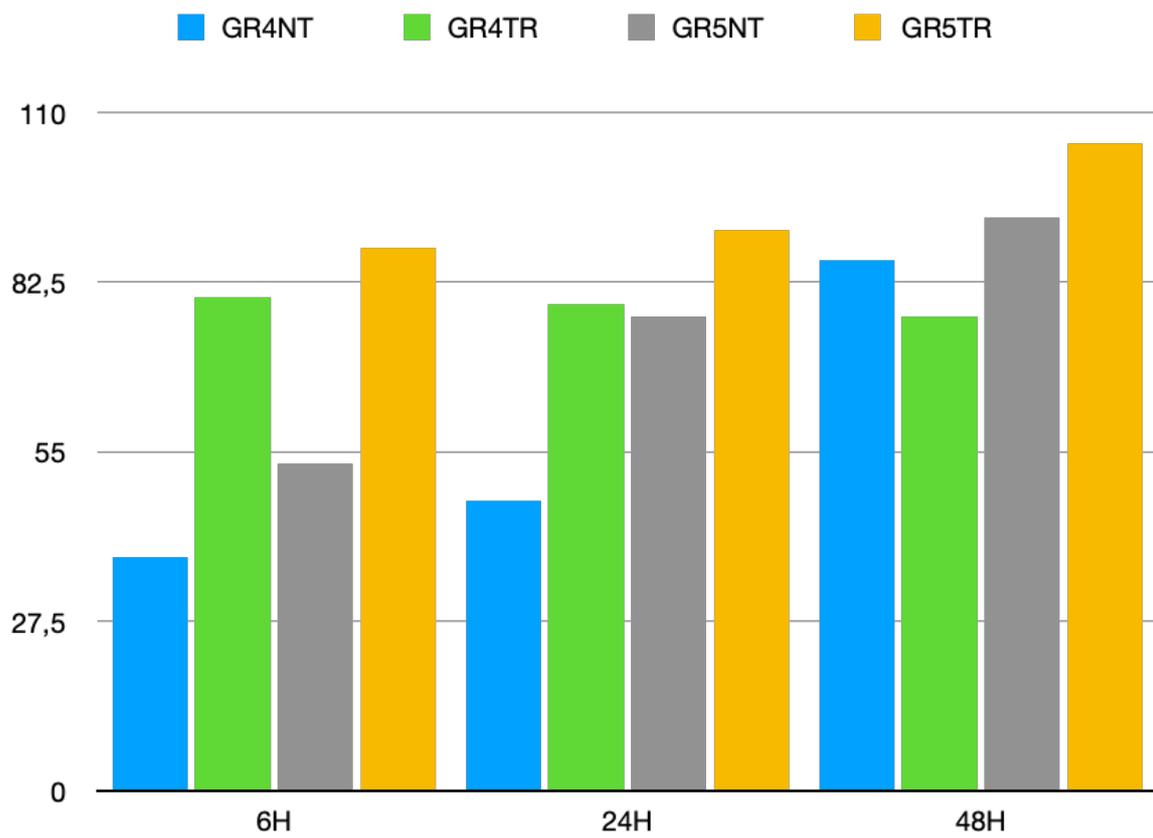


Gráfico 1. Porcentaje de viabilidad celular en los diferentes tipos de superficie a las 6, 24 y 48 h.

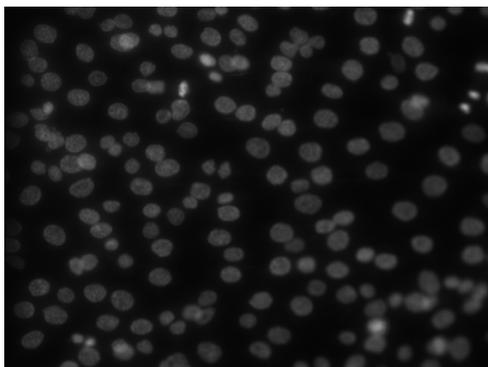


Figura18. GR4NT 6 horas.

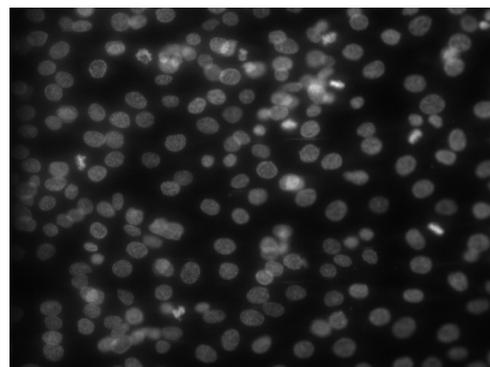


Figura 19. GR4NT 24 horas.

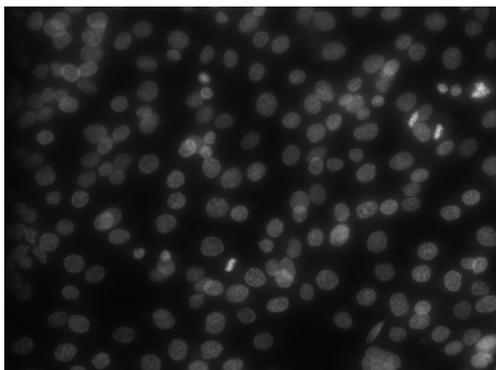


Figura 20. GR4NT 48 horas.

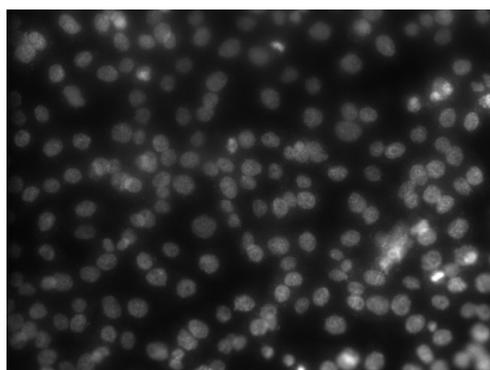


Figura 21. GR4TR 6 horas.

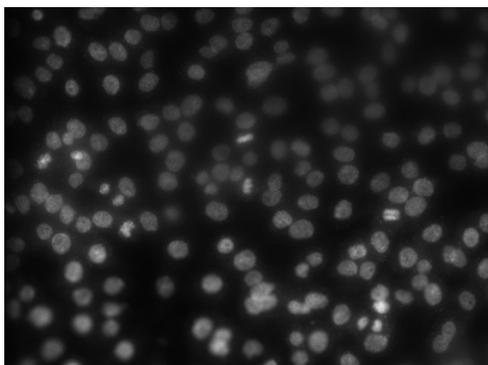


Figura 22. GR4TR 24 horas.

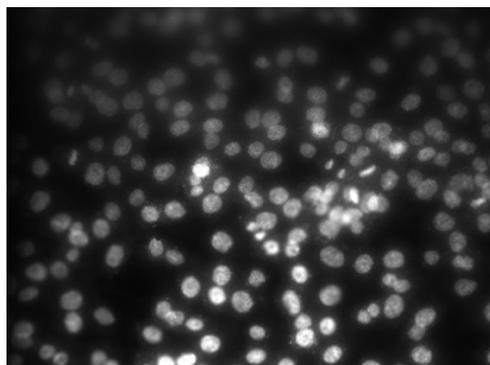


Figura 23. GR4TR 48 horas.

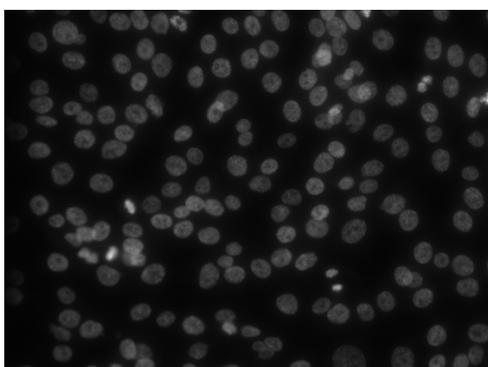


Figura 24. GR5NT 6 horas.

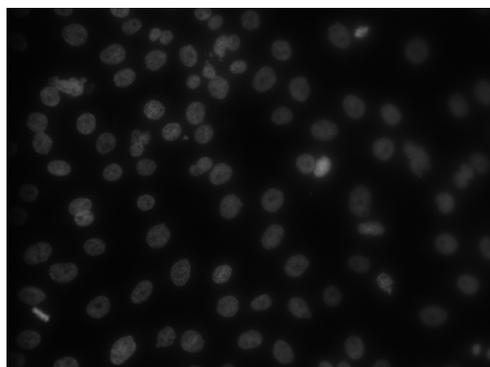


Figura 25. GR5NT 24 horas.

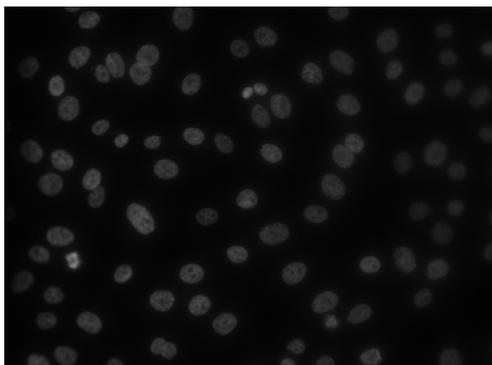


Figura 26. GR5NT 48 horas.

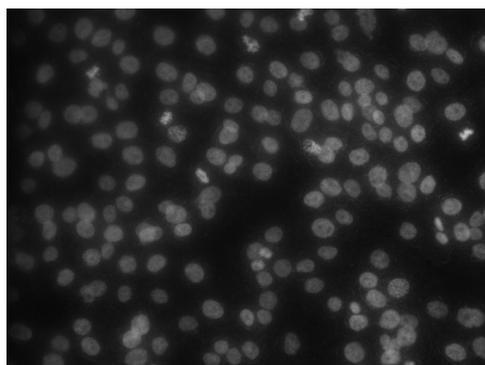


Figura 27. GR5TR 6 horas.

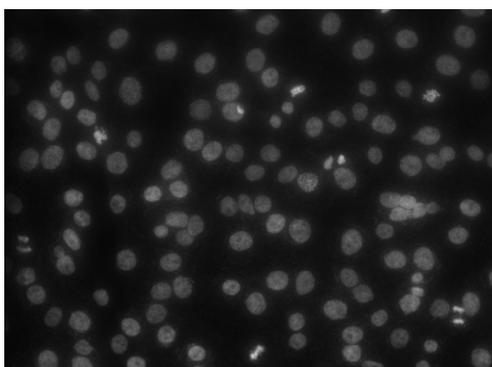


Figura 28. GR5TR 24 horas.

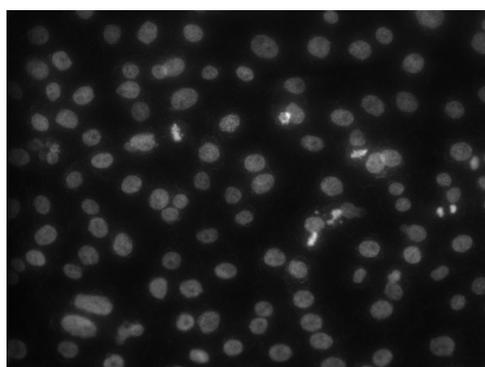


Figura 29. GR5TR 48 horas.

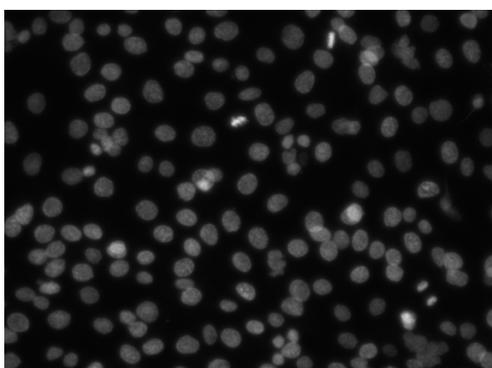


Figura 30. Grupo de control 6 horas.

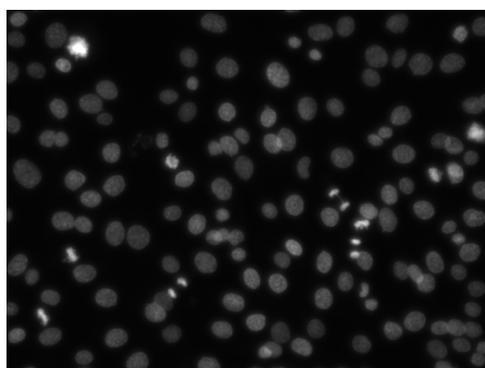


Figura 31. Grupo de control 24 horas.

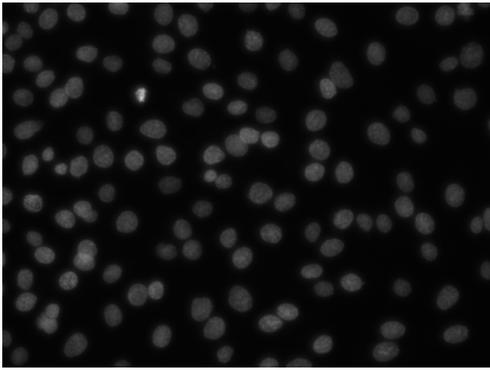


Figura 32. Grupo de control 48 horas.

Los datos obtenidos en este estudio indican que la viabilidad celular medida a las 6 y 24 horas fue mayor en ambos grupos de titanio IV y V tratados con plasma de argón (diferencias estadísticamente significativas). Por otro lado, la viabilidad a las 48 horas fue mayor en ambos grupos de titanio V (tratados o no) que en los grupos de titanio de grado IV. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

5.2. Análisis morfológico de las células

Se utilizaron microfotografías de fluorescencia para el análisis morfológico después de 24 horas de incubación.

La célula cultivada MG-63 mostró procesos celulares similares a filopodios que indican la adhesión celular a la superficie (Figura 33).

Imágenes de microscopio confocal de MG-63 en la superficie de los diferentes grupos de estudio:

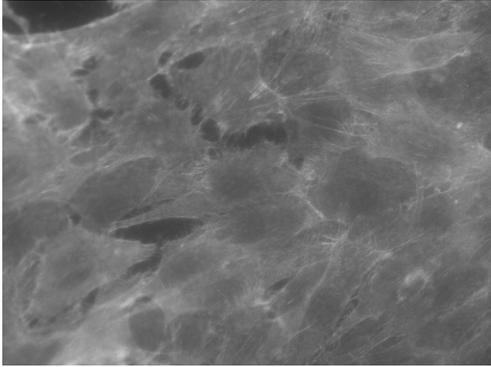


Figura 33. GR4NT.

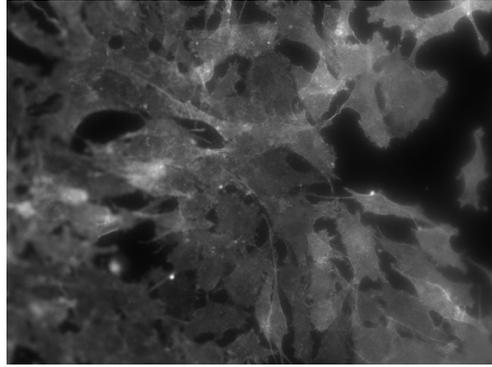


Figura 34. GR4TR.

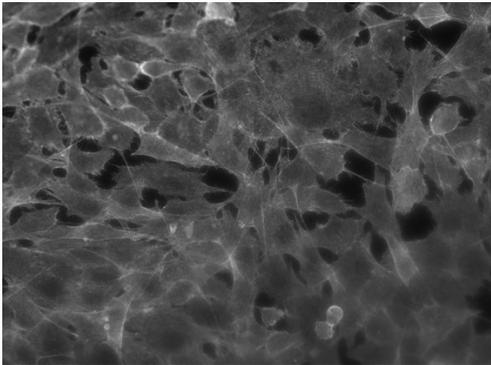


Figura 35. GR5NT.

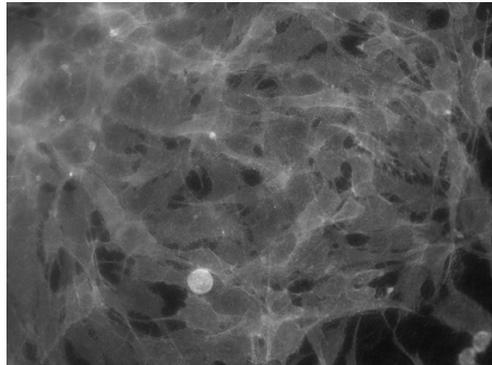


Figura 36. GR5TR.

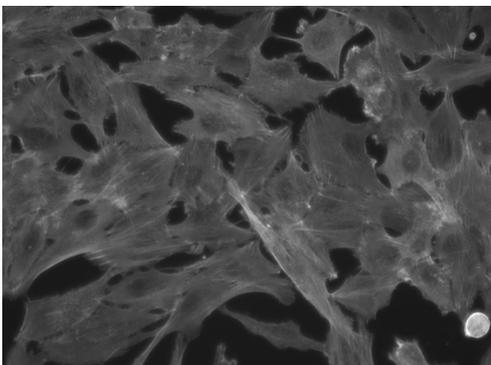


Figura 37. Grupo de control.

En las imágenes se pueden observar procesos celulares similares a filopodios.

Ambos grupos de plasma de argón mostraron un área celular promedio mayor en comparación con aquellos sin tratamiento con plasma frío.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos GR4NT-GR4TR y GR5NT-GR5TR. Las células cultivadas en las superficies con un tratamiento con plasma de argón se agrandaron en comparación con las células en discos no tratados. En cuanto a los valores de circularidad, los valores en la superficie GR4NT fueron mayores en comparación con los otros grupos. Esto se interpretó como células más redondas y, por tanto, menos extendidas o adaptadas en la superficie sin tratamiento con plasma de argón. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en el grupo que no recibió tratamiento de descontaminación (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de área celular y circularidad obtenidos en las cuatro superficies analizadas

CELL PARAMETER	TITANIO IV (GR4NT)	TITANIO IV (GR4TR)	TITANIO V (GR5NT)	TITANIO V (GR5TR)
AREA	430 ± 208 a μm ²	1212 ± 412 b μm ²	525 ± 184 c μm ²	1474 ± 425 abc μm ²
CIRCULARIDAD	0.42 ± 0.02 ab	0.38 ± 0.03 c	0.30 ± 0.03 acd	0.34 ± 0.01 b

Tabla 8. Valores de área celular y circularidad obtenidos en las cuatro superficies analizadas

Nota: En la misma fila, los pares de letras idénticas (a-a, b-b, ...) Identifican valores con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

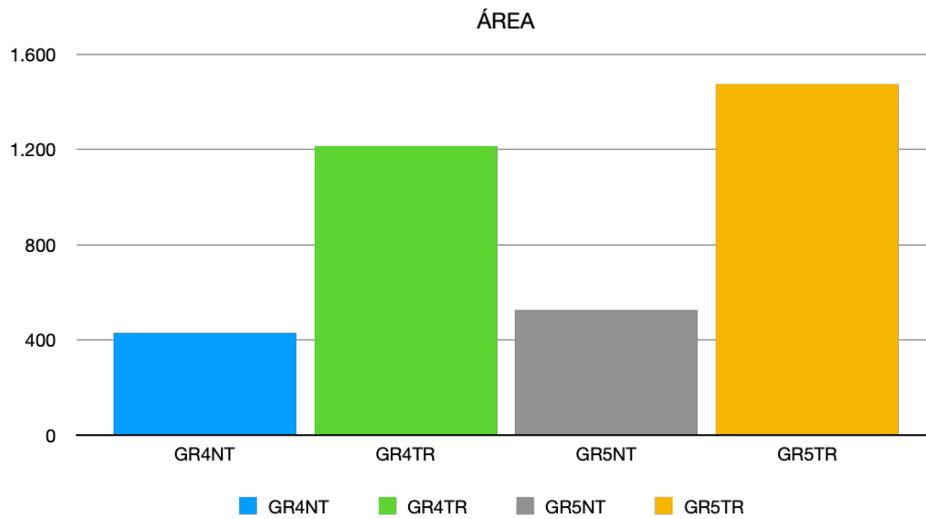


Gráfico 2. Valores de área celular.

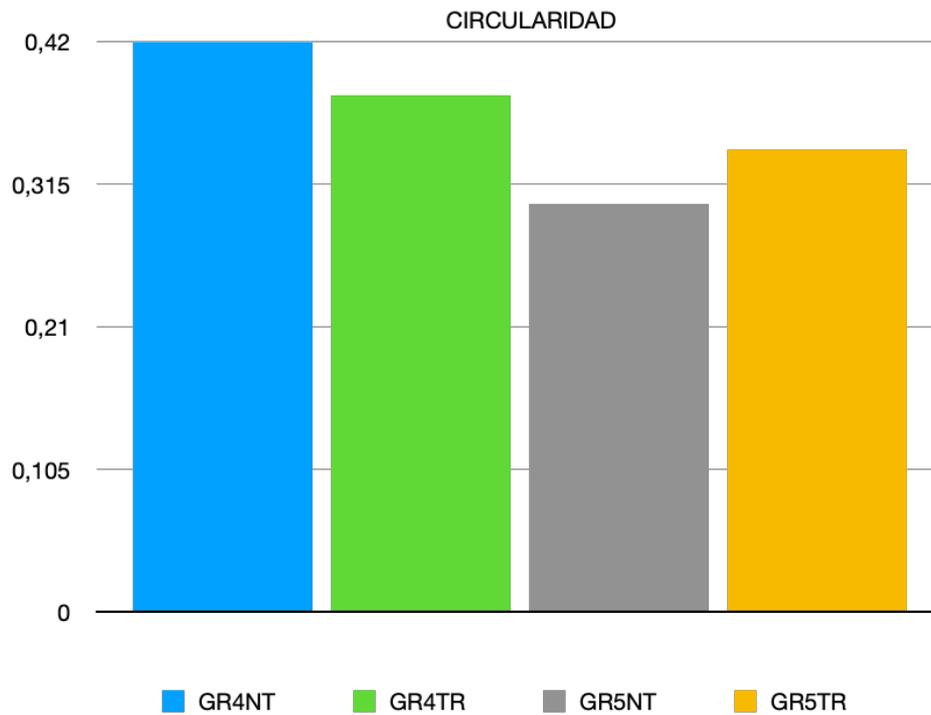


Gráfico 3. Valores de circularidad

En cuanto al área de la célula, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos GR4NT-GR5TR, GR4TR-GR5TR y GR5NT-GR5TR. Las células con valores circulares más pequeños (y por tanto con una forma de huso y un esparcimiento mayor) fueron las cultivadas en la superficie de titanio de Grado V.

5.3. Análisis del balance energético mitocondrial

Se analizó el balance de energía mitocondrial en las cuatro superficies utilizando filtros verde y rojo (Tabla 9) y microscopía de fluorescencia confocal.

La relación se calculó utilizando los resultados obtenidos con el citómetro. Se observó una actividad mitocondrial superior en las células MG-63 en el grupo GR4TR que en el grupo GR4NT; sin embargo, se observó una actividad más baja en el GR5TR que en el grupo GR5NT, con el grupo GR5TR el balance energético fue similar al control negativo.

Tabla 3. Resultados de la determinación del balance energético mitocondrial con tinción JC-1 después de 24 h de incubación.

Tabla 9. Determinación del balance energético con tinción JC-1 tras 24 h de incubación para los diferentes grupos de estudio y los controles positivos y negativos

TITANIO IV (GR4NT)	TITANIO IV (GR4TR)	TITANIO V (GR5NT)	TITANIO V (GR5TR)	CONTROL (CTR)	XANTINA OXIDASA (OX)
--------------------------	--------------------------	-------------------------	-------------------------	------------------	----------------------------

BALANCE ENERGÉTICO MITOCONDRIAL	4.56 ± 0.58 abcd	11.88 ± 0.60 ^a	13.40 ± 1.04 be	10.93 ± 2.66 cef	13.2 ± 1.7 df	3.7 ± 0.5 *
--	---------------------	---------------------------	--------------------	---------------------	------------------	-------------

Nota: En la misma fila, los pares de letras idénticas (a-a, b-b, ...) identifican valores con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). * El grupo xo mostró diferencias estadísticamente significativas de todos los grupos.

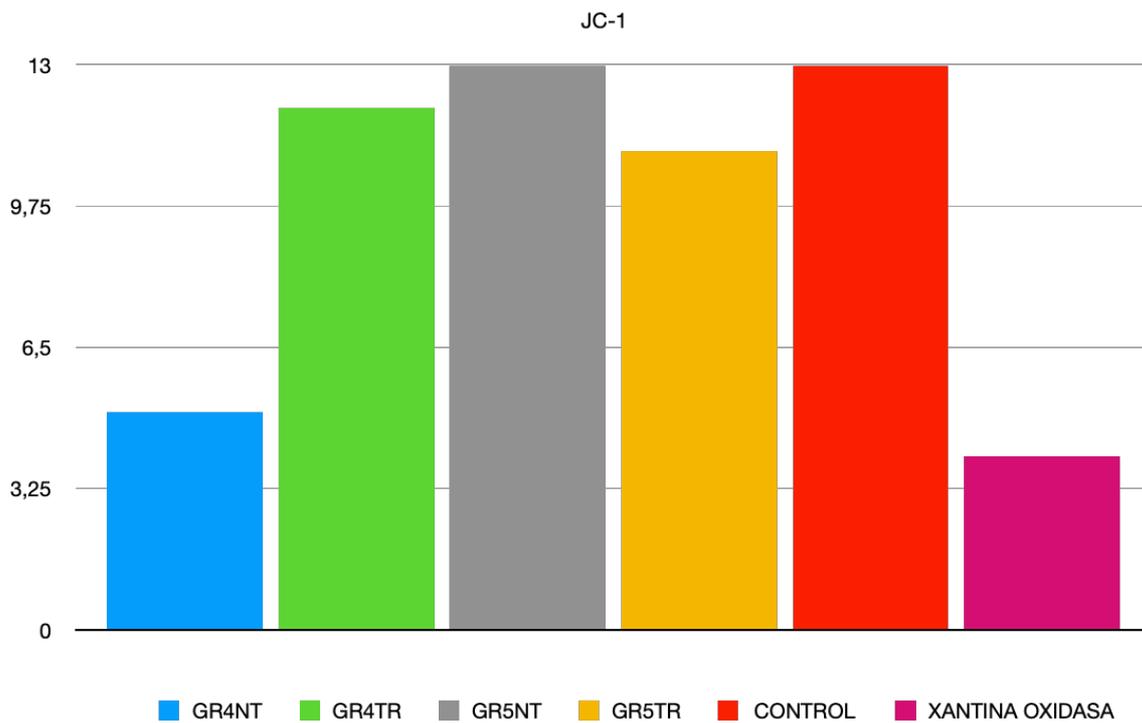


Gráfico 4. Evaluación del balance energético mitocondrial con JC-1 tras 24 h de incubación para los diferentes grupos de estudio y los controles positivos y negativos

En las siguientes imágenes se analizó el balance de energía mitocondrial en grupos de trabajo, utilizando filtros verde y rojo y microscopía de fluorescencia confocal 24 horas después de la siembra (40 aumentos).

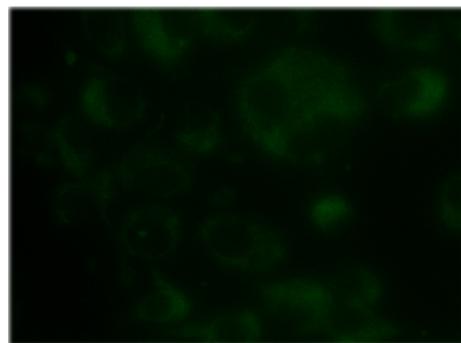
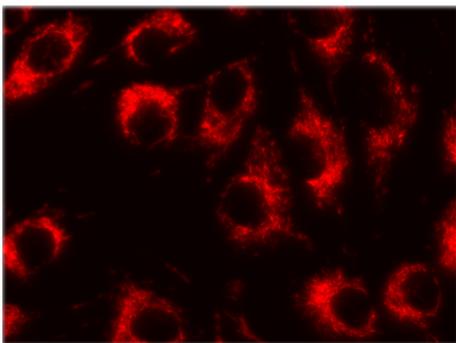


Figura 38. GR4NT.

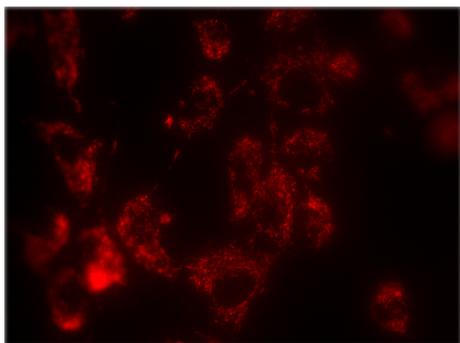


Figura 39. GR4TR.

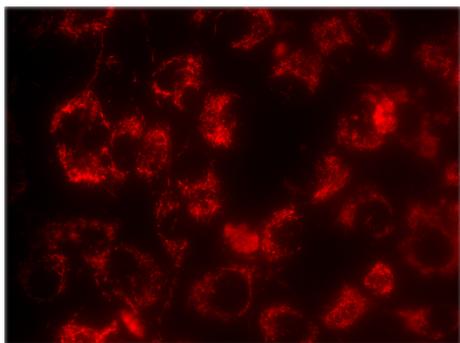
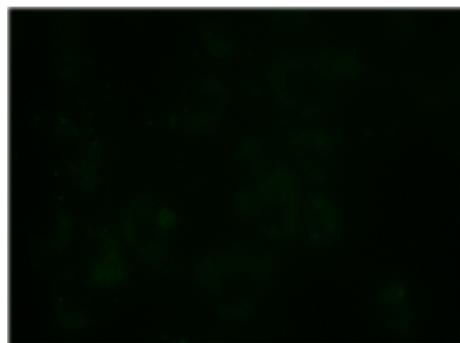


Figura 40. GR5NT.

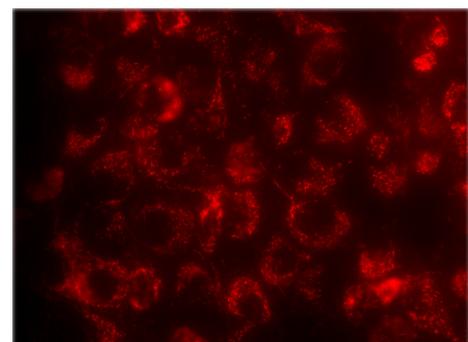
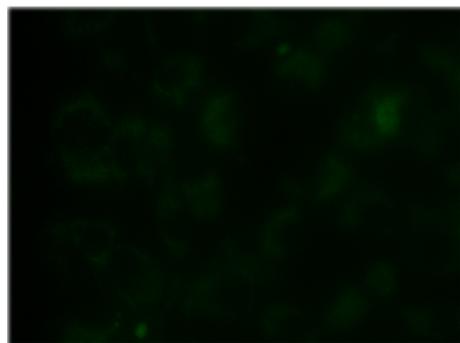


Figura 41. GR5TR.

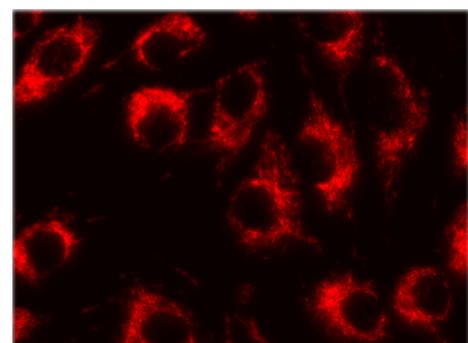
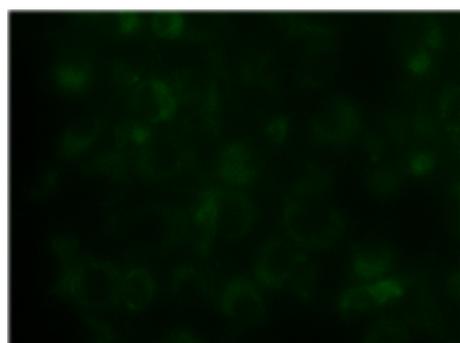
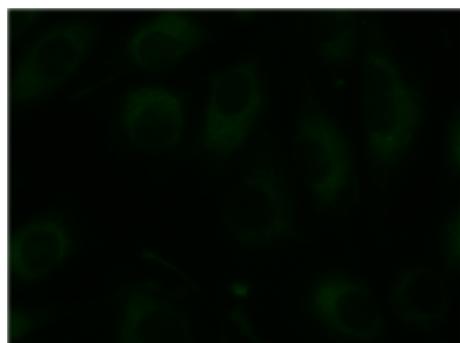


Figura 42. Grupo control positivo.



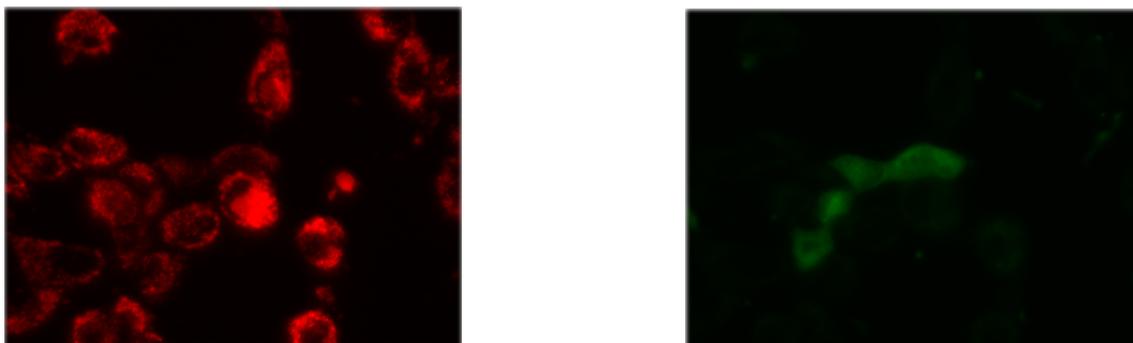


Figura 43. Xantina oxidasa.

El daño mitocondrial a las células MG-63 en el GR4TR fue mayor que en el GR4NT; se observó un mayor daño mitocondrial en el GR5NT en comparación con el GR5TR.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

La contaminación ambiental de la superficie de los implantes dentales, previa a su colocación, por partículas como carbono, sodio o calcio es un hecho inevitable, que involucra, según a la literatura, una disminución de la osteoconductividad o adsorción de proteínas y, en consecuencia, una disminución en el contacto máximo de la superficie del implante con el hueso (177). Uno de los problemas actuales en la terapia de implantes de titanio es la integración incompleta. El porcentaje de contacto hueso-titanio notificado es del $45 \% \pm 16 \%$ o del 50% al 65% como máximo, que es bastante inferior al valor ideal. La mayoría de los implantes fallan debido a una fijación incompleta o a cambios destructivos tempranos/tardíos en la interfaz hueso-implante. Hasta hace poco, un suministro limitado de células madre había sido la única explicación hipotética para dicha formación ósea incompleta. El porcentaje notificado de contacto óseo-implante es muy inferior al 100% , rara vez se ha investigado la causa de estos bajos niveles de formación ósea. Hayashi y cols., probaron el efecto biológico negativo de la deposición de hidrocarburos en las superficies de titanio, que se ha informado como inevitable. Las células osteogénicas MC3T3-E1 (MC3T3 es una línea celular precursora de osteoblastos derivada de *Mus musculus calvaria*. Se han aislado varios derivados de esta cepa para seleccionarlos según diversos grados de potencial osteogénico y se han utilizado ampliamente como sistemas modelo en biología ósea.), se cultivaron en discos de titanio en los que la concentración de carbono se reguló experimentalmente para lograr proporciones carbono/titanio (C/Ti) de 0,3, 0,7 y 1,0. Las actividades celulares iniciales, como la unión y la propagación celulares, fueron suprimidas de forma dependiente de la concentración por la cantidad de carbono en la superficie del titanio. Las funciones osteoblásticas de la actividad de la fosfatasa alcalina y la mineralización del calcio

también se redujeron en más de un 40 % en la superficie C/Ti (1,0). Estos resultados indican que la actividad osteoblástica está influenciada por el grado de contaminación por hidrocarburos en los implantes de titanio y sugieren que la descomposición de hidrocarburos antes de la colocación del implante puede aumentar la biocompatibilidad del titanio.

El titanio es un material ampliamente utilizado en el campo médico para prótesis ortopédicas y odontología de implantes. Se ha invertido mucho tiempo y esfuerzo en analizar la naturaleza química y física de la capa de óxido en su superficie (178). Es bien conocido por ser no tóxico, estable, de fácil acceso y por tener grandes propiedades mecánicas; módulos de elasticidad; alta relación resistencia/peso y, sobre todo, excelente resistencia a la corrosión. Sin embargo, todavía parece posible hacer nuevos descubrimientos que mejoren sus cualidades. El titanio recién cortado parece ser más activo en la promoción de la unión a proteínas y la adhesión celular que el titanio de cuatro semanas o más. La disminución de la actividad biológica está relacionada con la inevitable deposición de hidrocarburos en su superficie, también conocida como envejecimiento biológico. Para contrarrestar este fenómeno es necesario eliminar la contaminación presente en la superficie; esto a su vez restaurará e incluso mejorará las propiedades del titanio. La fotofuncionalización UVC (luz ultravioleta de onda corta) se ha introducido como un método válido para eliminar la contaminación por hidrocarburos. La UV, radiación ultravioleta, corresponde a una radiación electromagnética más corta que la luz visible, en el rango de longitud de onda de 100-400 nm. El estudio de Marco Roy y cols., se centró en las longitudes de onda en el intervalo de 100-280 nm, correspondientes a los rayos UVC. La recontaminación de la superficie es, por desgracia, un fenómeno muy rápido teniendo en cuenta que solo se necesitan cuatro semanas para

que los implantes de titanio recién cortados o previamente fotofuncional, queden de nuevo cubiertos con hidrocarburos, independientemente del tipo de tratamiento superficial al que se hayan sometido. Por tanto, se conoce que esta deposición de impurezas de carbono es incremental en el tiempo hasta la saturación. La contaminación bacteriana y orgánica relacionada en las superficies de titanio es un problema crucial que compromete la osteointegración y desencadena la periimplantitis en la implantología dental.

Una vez que se ha producido la infección, la reabsorción ósea incontrolable puede provocar la pérdida del implante. Aunque la contaminación se limpia por completo, las superficies de titanio permanecen expuestas a contaminantes bacterianos y orgánicos. Esos contaminantes se acumulan continuamente en las superficies de titanio expuestas, que idealmente deberían reintegrarse con el tejido óseo recién formado. Sin embargo, la influencia de dicha contaminación en la función osteoblástica no se comprende por completo.

En los últimos años se han desarrollado varias técnicas además de la descontaminación mediante rayos UV (ultravioleta); tratamientos con plasma frío o plasma no térmico para mejorar la respuesta celular en la superficie. Los tratamientos mínimamente invasivos, como la terapia fotodinámica o el láser de plasma de argón, pero no se ha informado de un gran beneficio (179). Si bien se han intentado procedimientos quirúrgicos y reconstructivos para tratar la periimplantitis, no se han establecido procedimientos efectivos que puedan esperar cierta regeneración ósea. El tratamiento abrasivo de polvo de aire con hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP) en la superficie de titanio infectada podría eliminar el 99% de las biopelículas. Parecía ser un

procedimiento bueno y menos invasivo como opción de tratamiento, pero la reintegración de la superficie de titanio expuesta después de la abrasión no es segura.

También se ha informado que el tratamiento con luz ultravioleta es una herramienta eficaz para limpiar la contaminación orgánica acumulada en los dispositivos médicos. Además, se ha informado que el tratamiento con luz ultravioleta mejoró el comportamiento de los osteoblastos y el efecto antibacteriano en las superficies de titanio. La luz ultravioleta podría limpiar los hidrocarburos acumulados y mejorar la unión de los osteoblastos en la superficie de titanio. El osteoblasto en las superficies de titanio tratadas con UV se extiende bien con una mayor expresión del marcador de adhesión celular, vinculina, en comparación con las superficies de titanio no tratadas. La vinculina desempeña un papel en el establecimiento de la unión celular. El agotamiento de la vinculina inducida por especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS) aumentó la apoptosis de las células neurales. Luego, el aumento de ROS extracelular en los biomateriales afectó al desprendimiento celular al minimizar el área de adhesión focal de la vinculina. Además, la vinculina juega un papel importante en la supervivencia celular y tiene un efecto antiapoptótico en las células osteogénicas. La viabilidad de los osteoblastos en la superficie de titanio estaría directamente relacionada con la calcificación y, en consecuencia, con la osteointegración. Por lo tanto, la limpieza de la contaminación y la restauración del comportamiento y la función de los osteoblastos en las superficies de titanio serían posibles simultáneamente mediante luz ultravioleta. Para probar esta hipótesis, se prepararon discos de titanio grabados con ácido contaminados con saliva humana y placa dental y se limpiaron la contaminación con luz ultravioleta. Se evaluaron el comportamiento y la función de los osteoblastos para acceder a la influencia de la contaminación orgánica y el tratamiento con luz ultravioleta.

El objetivo de nuestra investigación fue estudiar si la descontaminación con plasma de argón conducía a una mayor viabilidad celular en comparación con la no descontaminación de las superficies de implantes de titanio de grado IV y V con tratamiento SLA. Además, se evaluaron otros parámetros celulares, como la viabilidad celular en diferentes horas, el análisis morfológico de las células, que incluía el estudio del área celular y la circularidad, que podrían indicar el grado de adaptación celular en las superficies estudiadas. Finalmente, se analizó el balance energético mitocondrial como una medida de estrés celular y apoptosis.

El objetivo clínico de un implante dental es obtener un anclaje seguro del implante en el hueso, idealmente para toda la vida. Incluye la capacidad del implante para transportar y mantener la carga estática y dinámica a la que está sometido. Es deseable que este objetivo se alcance en el menor tiempo de curación posible, con una pequeña tasa de fallos y con una mínima molestia para el paciente (180). La aceptación del implante por parte del cuerpo humano, el inicio del proceso de curación ósea y el posterior crecimiento del nuevo tejido óseo en la superficie del implante se denomina osteointegración. Una de las fuerzas impulsoras de la actividad de investigación en curso en implantología dental es la reducción del tiempo de este proceso. A este respecto, la selección de materiales para un implante dental es crítica y se basa en sus diversas propiedades químicas y físicas requeridas. Hoy en día, la mayoría de los implantes dentales se fabrican a partir de Ti comercialmente puro (de diferentes grados dependiendo del fabricante) y de aleaciones a base de titanio, como Ti6Al4V. Las propiedades bioinertes de las aleaciones a base de Ti se han relacionado con una capa de TiO₂ formada naturalmente de 2-5 nm de espesor en la superficie del titanio. Sin embargo, también es necesario estudiar el efecto de varias fases diferentes, como los nitruros de titanio y los

oxinitridas. Se sabe que el TiN posee excelentes propiedades mecánicas, estabilidad química y biocompatibilidad. Su uso para implantes de cadera, rodilla, hombro y tobillo ha llevado a una mayor resistencia a la abrasión superficial y a una reducción de la colonización bacteriana en comparación con otras superficies de implantes utilizadas clínicamente. El TiN se puede producir nitrurando la superficie del implante Ti o depositando un revestimiento TiN en la superficie del implante (en este caso, el implante no tiene que estar necesariamente hecho de Ti). Muchas técnicas de PVD y CVD y sus variantes, así como el uso de plasma, han demostrado tener éxito en la formación de varios compuestos TiN_x estequiométricos y no estequiométricos. El proceso de nitruración es bastante más limitado. Varios trabajos muestran el uso exitoso del plasma en la nitruración de muestras de Ti a temperaturas de alrededor de 700 y 800 °C. Sin embargo, debido a la alta temperatura del proceso, las pequeñas muestras de Ti de geometría compleja se distorsionan con frecuencia. No conocemos estudios previos de nitruración de implantes de Ti utilizando secreción de cátodo hueco. El uso de plasma también puede ser beneficioso para cambiar la topografía de la superficie, aumentar la rugosidad de la superficie, en la limpieza/esterilización y para aumentar la humectabilidad de la superficie. Este es uno de los varios estudios en la literatura que han analizado el efecto del tratamiento con argón-plasma sobre superficies de titanio, el cual ha sido ampliamente utilizado en los últimos años, principalmente por su versatilidad.

En nuestro estudio, se observó que la viabilidad celular después de seis, 24 y 48 horas fue mayor en superficies de titanio descontaminadas con plasma de argón. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos después de 48 horas, lo que podría deberse a la confluencia celular. Los valores de viabilidad encontrados en el grupo tratado con plasma de argón, de titanio IV son similares a los

encontrados por Rizo-Gorrita y cols., quienes realizaron un estudio sobre implantes de titanio de grado IV con superficies SLA en los que se empleó tratamiento con plasma de argón. Como las superficies de los implantes comerciales pueden contaminarse durante los procesos de fabricación al estar en contacto con diferentes herramientas o sustancias o durante el proceso de pasivación ácida, se llevan a cabo tratamientos como la aplicación de argón, helio o plasma de oxígeno.

La limpieza de las impurezas de carbono de la superficie del implante se ha realizado mediante la aplicación de plasma de argón, que es un tratamiento superficial ampliamente utilizado y reproducible. Se basa en la aplicación de un flujo que crea una atmósfera gaseosa que no es reactiva a temperatura ambiente, que contiene diferentes elementos, como iones o electrones que se aceleran en un campo eléctrico y se impactan contra la superficie del implante. Este bombardeo permite eliminar contaminantes.

En nuestro estudio se sembraron células MG-63 y se calculó el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control (100%), después de seis, 24 y 48 horas. A las 24 horas, hubo diferencia estadísticamente significativa en los grupos de tipo titanio, donde la viabilidad celular fue mayor en las superficies tratadas con plasma de argón. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas después de 48 horas.

En nuestro estudio, se realizó un análisis XPS (espectroscopía de fotoelectrones de rayos X) (PHI 5400 ESCA Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) y mostró un menor contenido de carbono después del tratamiento con plasma de argón. Se podría interpretar que el tratamiento de argón conduce a un menor contenido de partículas contaminantes en la superficie del titanio y mejora la viabilidad celular, lo que conduce a una mejor propagación celular en la superficie y una mayor actividad mitocondrial.

Otros autores también han comparado el tratamiento superficial para disminuir las contaminaciones de las superficies a base de plasma de argón con técnicas como el plasma de oxígeno o la funcionalización de la superficie por radiación UV justo antes de la colocación del implante, parece ser un método muy prometedor para mejorar las interacciones entre las proteínas, las células y la superficie del titanio, para mejorar la bioactividad, la velocidad de osteointegración y la aposición ósea periimplantaria. La funcionalización de la luz UV o NTP del material de implante de titanio condujo a una mayor humectabilidad y atractivo para las células en superficies de titanio (178) y a una osteointegración temprana. Henningsen y cols. compararon las técnicas de descontaminación de superficies que utilizan radiación UV, oxígeno o plasma de argón con respecto a la deposición de carbono, la viabilidad y el crecimiento celular después de 48 horas. Se encontró que ninguna de las técnicas cambió la superficie de los discos; sin embargo, mejoraron su humectabilidad, mostrando una diferencia significativa del grupo en comparación con el control, pero no se encontró una diferencia significativa entre el plasma de argón y el plasma de oxígeno. Además, se observó una reducción en los niveles de deposición de carbono con los tres tratamientos. Al mismo tiempo, se observó un aumento en el espesor de la capa de óxido de titanio, que fue mayor tras la descontaminación con plasma de argón. Se observó un mejor anclaje y crecimiento celular a las 48 horas en los discos tratados con plasma de argón en comparación con los tratados con plasma de oxígeno, radiación UV y control. En general, los autores informaron que las células de los discos tratados con plasma de argón mostraron un comportamiento ligeramente mejor que las células de los discos tratados con plasma de oxígeno con respecto a la unión celular y la viabilidad celular. Se ha demostrado que el tratamiento con chorro de plasma de presión atmosférica ultravioleta (UV) o no térmica

(NTAPPJ) modifica las propiedades fisicoquímicas del titanio y mejora su capacidad biológica sin alterar la topografía. Estos tratamientos pueden cambiar la superficie de titanio de hidrófoba a hidrófila debido a la eliminación de hidrocarburos superficiales y/o la formación de especies de radicales hidroxilo químicamente reactivos con una carga negativa superficial reducida. Además, Bacakova y cols. informaron de que la adhesión celular fue promovida por una superficie moderadamente hidrófila y con menos carga negativa. Sin embargo, la mayoría de los estudios anteriores solo han investigado las respuestas celulares inmediatamente después del tratamiento con cada método. Por ejemplo, Canullo y cols. (174) informaron que los efectos beneficiosos de varias superficies implantadas de titanio inmediatamente después del tratamiento con plasma de argón durante 12 minutos fueron comparables a los inmediatamente después del tratamiento UV durante tres horas *in vitro*. Basándose en el potencial de aplicación clínica, el estudio incluyó tiempos de irradiación considerablemente diferentes para los dos métodos, aunque el tiempo de irradiación UV probablemente podría acortarse utilizando lámparas de flujo UV más altas. Además, el estudio se centró únicamente en los efectos inmediatos del tratamiento en la respuesta celular. Choi y cols. (154) obtuvieron resultados similares.

En nuestro estudio no se observaron diferencias entre grupos en cuanto a viabilidad a las 48 horas, y esto podría deberse a que la estabilización del cultivo celular llega a confluencia.

Por otro lado, Smeets y cols. obtuvieron una mayor proliferación y viabilidad celular después de 24 y 48 horas con plasma de oxígeno atmosférico frío en comparación con plasma de argón atmosférico frío cuando los osteoblastos se sembraron sobre una superficie de circonio. La estructura superficial y la rugosidad no se vieron afectadas por

los tratamientos superficiales. La irradiación CAP y UV redujo significativamente el material orgánico y aumentó la oxidación de la superficie en las muestras de zirconio. Además, el tratamiento CAP y UV disminuyó significativamente el ángulo de contacto en las muestras de zirconio, lo que indica superhidrofilia. La unión celular aumentó significativamente en las muestras de zirconio tratadas con plasma de oxígeno en comparación con las muestras no tratadas en todo momento ($p < 0,001$). Después de 24 y 48 horas, la proliferación celular y la viabilidad ($p < 0,001$) aumentaron significativamente en las muestras tratadas con plasma de oxígeno en comparación con las muestras no tratadas, tratadas con UV y tratadas con plasma de argón. Ni el tratamiento UV ni CAP condujo a citotoxicidad. Según los autores, este fenómeno podría explicarse por el hecho de que la longitud de onda utilizada en el plasma de oxígeno (240 nm) se acerca más a la longitud de onda necesaria para expresar la actividad fotocatalítica de la superficie de zirconio (213 nm). La luz ultravioleta y el plasma de argón generaron más longitudes de onda (aproximadamente 250 nm). En otro estudio de Henningsen y cols., los discos de titanio y circonio de grado IV se trataron con radiación UV u oxígeno o plasma de argón. No hubo cambios en la rugosidad, pero los grupos de plasma no térmico lograron mejores parámetros en cuanto a humectabilidad y análisis de superficie XPS. El plasma de argón puede ofrecer el mejor tratamiento para obtener la mejor humectabilidad de la superficie, la capa más alta de óxido de titanio y la menor deposición de carbono en las superficies. Los enfoques más recientes son las modificaciones biológicas o farmacéuticas, que son objeto de investigaciones actuales (181). En general, el titanio y la circonia son los materiales preferidos para los implantes dentales. Como resultado de la exposición al entorno intraoral y a las altas fuerzas masticatorias, se requiere que los implantes dentales posean una mayor resistencia a la corrosión y a la

contaminación bacteriana, además de una conexión sólida de implante a hueso, que los implantes ortopédicos. El contacto hueso-implante (BIC) se utiliza ampliamente en la investigación para evaluar la osteointegración, y el valor BIC depende del material del implante, las condiciones de la superficie (rugosidad, topografía, química), el momento de curación, el aumento utilizado en las evaluaciones y, por último, pero no menos importante, del operador. Los valores típicos de BIC oscilan entre el 52 % y el 78 %, pero no alcanzan el 100 % ideal. Un factor que podría explicar la osteointegración menos que ideal podría ser el envejecimiento biológico del implante durante el período comprendido entre la fabricación y la inserción como resultado de la carbonización y la contaminación orgánica de la superficie del implante de la atmósfera, lo que conduciría a un envejecimiento superficial del implante dependiente del tiempo. Se supone que después de cuatro semanas de almacenamiento en el embalaje habitual, las superficies de titanio y circonio están saturadas con compuestos de carbono. Las superficies de titanio de cuatro semanas mostraron solo la mitad de la fuerza de la integración hueso-implante en comparación con las superficies de titanio recién preparadas después de dos semanas de curación in vivo y el BIC se redujo en más de un 30 %.

Es plausible que el tratamiento de la superficie del implante con luz ultravioleta (UV) o plasma no térmico justo antes de la colocación del implante pueda conducir a la eliminación de la contaminación orgánica y aumentar la humectabilidad de la superficie del implante con el fin de atraer proteínas y células sin cambiar las propiedades de la superficie. Varios estudios han demostrado que la luz UV y los tratamientos de plasma no térmicos son capaces de disminuir la cantidad de compuestos de carbono en el titanio. Danna y cols. observaron una disminución de los niveles de carbono y un aumento de los niveles de titanio y oxígeno en los discos de titanio puro después del tratamiento

superficial con un dispositivo de plasma no térmico. En un estudio reciente de Roy y cols., el carbono presente en la superficie de los discos de titanio puro disminuyó sustancialmente después de la irradiación UV-C (espectros de luz UV 200-280 nm). También descubrieron que la luz UV-C era capaz de aumentar la cantidad de hidróxido de titanio y disminuir la cantidad de agua. Propusieron un nuevo modelo de los efectos de la luz UV en superficies de titanio saturadas con grupos carboxilos: cuando se aplican fotones de alta energía a la superficie, pueden ser capaces de romper los enlaces relativamente débiles entre los grupos carboxilo y el titanio, mejorando así la posibilidad de unirse con los átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre en las proteínas.

Además de la química de la superficie, la estructura microscópica, la rugosidad de la superficie y la humectabilidad son factores a tener en cuenta para la mejor osteointegración de los biomateriales. La alteración de la rugosidad de las superficies del implante puede influir en la unión de las células y el BIC. Sin embargo, cualquier alteración posterior a la fabricación de la estructura de la superficie provocaría la pérdida de la garantía del fabricante. El tratamiento con plasma suele ser un proceso sustractivo y es posible un aumento de la rugosidad de la superficie y la alteración de la estructura de la superficie después de aplicar plasma no térmico. Las características de la superficie modulan la humectabilidad, que es un factor adicional que determina la capacidad biointegrativa de los biomateriales. La luz ultravioleta y el plasma no térmico son capaces de hidrofilar las superficies de titanio y zirconia. Ambos métodos son capaces de mejorar la respuesta temprana de las células a las superficies de los implantes y aumentar la velocidad de osteointegración. Hayashi y cols. encontraron una disminución significativa de la adsorción de albúmina, la unión celular, la propagación celular y la diferenciación de las células osteoblásticas murinas en superficies de titanio contaminado

con carbono inducidas experimentalmente. In vivo, Aita y cols. pudieron lograr un BIC de casi el 100 % después de 48 horas de tratamiento superficial con luz UV después de cuatro semanas de curación.

Aunque los implantes dentales se venden como dispositivos médicos en envases estériles con una vida útil típicamente de hasta cinco años, no hay información disponible sobre la durabilidad de la saturación de las superficies de los implantes con compuestos de carbono y, por lo tanto, su bioactividad. Solo se ha prestado una atención limitada a la estabilidad de la bioactividad de las superficies del implante a lo largo del tiempo.

Aunque varios estudios han indicado que la luz UV y el plasma no térmico son capaces de mejorar la química de la superficie y aumentar la humectabilidad de las superficies de titanio y circonio, actualmente no se sabe si la irradiación UV y los diferentes tratamientos de plasma no térmico son comparables para mejorar las condiciones fisicoquímicas de la superficie del titanio y el circonio después de un corto intervalo de tiempo definido de tratamiento superficial. Por lo tanto, se investigan los cambios en las características del material superficial después de un ciclo (12 minutos) de tratamiento con luz UV o plasma no térmico de argón u oxígeno, como lo demuestran la estructura electrones-microscópica y las medidas de rugosidad, hidrofiliación y química superficial de ambos materiales.

Esto podría explicar la mejora de los parámetros celulares morfológicos con mayor área celular y mayor difusión.

Canullo y cols. y Coelho y cols. estudiaron el efecto del tratamiento con argón-plasma en la respuesta biológica temprana utilizando diferentes técnicas de modificación

de superficies en implantes dentales. El plasma no térmico de argón (NTP) mostró una respuesta positiva en términos de adhesión de osteoblastos y adsorción de proteínas. Dentro de sus limitaciones, el estudio destacó los beneficios potenciales del tratamiento de la superficie del implante con plasma de argón (12 min) o UV (tres horas). En nuestro estudio, se observaron procesos celulares similares a los filopodios que indican la adhesión celular a la superficie, siendo más pequeños que los sembrados sobre titanio no tratado.

De Queiroz y cols. analizaron el efecto del tratamiento con plasma de argón en superficies de titanio de grado II con respecto a la cuantificación de la viabilidad celular comparándolo con superficies no tratadas, ya que la interacción metal-tejido parece estar estrechamente relacionada con los tratamientos superficiales aplicados a los biomateriales y con las propiedades fisicoquímicas resultantes de estos tratamientos. Los comportamientos celulares como la adhesión, los cambios morfológicos, la proliferación y la diferenciación están determinados principalmente por las características de la superficie, incluida la composición química, la rugosidad, la hidrofilia, la textura y la morfología de las capas de óxido de titanio (182).

La búsqueda de nuevas superficies que satisfagan la necesidad de obtener una rápida osteointegración, una mejor biocompatibilidad y resistencia mecánica ha dado lugar a varios estudios que utilizaron diferentes métodos para cambiar las propiedades superficiales del implante. Entre los diferentes métodos que modifican las superficies del material, los que utilizan el plasma como fuente de energía han sido los más utilizados en los últimos años, debido principalmente a su versatilidad.

El plasma se obtiene en el laboratorio a través de una descarga de gas eléctrico, aplicando una diferencia de potencial entre dos electrodos insertados en una cámara a

presiones inferiores a 100 Pa. La diferencia en el potencial explica la aceleración de los electrones que chocarán con los átomos y moléculas neutros del gas, produciendo iones y nuevos electrones. Los iones producidos se aceleran al electrodo catódicamente polarizado, participando en una serie de efectos. Estos incluyen el calentamiento de cátodos por transferencia de energía iónica, la creación de defectos mediante la eliminación de átomos superficiales, colisiones elásticas y la reacción superficial acelerada causada por la presencia de especies más activas que las que se encuentran en los procesos convencionales.

A pesar de los muchos estudios realizados para evaluar la respuesta celular en las diferentes superficies de titanio disponibles comercialmente, se ha prestado poca atención al potencial genotóxico de estas superficies. Solo unas pocas investigaciones han tenido como objetivo evaluar el potencial genotóxico de las partículas de titanio puro, de las aleaciones metálicas a base de titanio y de las partículas de hecho, solo hay un registro en la literatura de la evaluación genotóxica de las superficies del disco de titanio, el estudio de Wang y Li (1998), que evaluó la mutagenicidad de los discos y aleaciones de titanio puros no modificados (Ti-Ag, Ti-Co, Ni-Cr).

Se obtuvo una viabilidad de 72 horas superior al 80% en las superficies tratadas, así como una mejor adhesión celular al aumentar la hidrofiliidad de la superficie con el tratamiento con argón-plasma. Nuestro estudio se realizó bajo parámetros experimentales similares y se obtuvieron resultados similares a las 48 h, alcanzando la viabilidad el 80% en la mayoría de los grupos.

En el estudio de Tavares y cols., que se llevó a cabo en discos de titanio utilizando titanio pulido comercialmente puro, las superficies de titanio tratadas con plasma de argón mostraron un efecto menos genotóxico.

En cuanto a la cuantificación de la medida del tamaño celular, se obtuvo una mayor área celular promedio (μm^2) en el titanio V con plasma de argón que en el resto de los grupos; las células sembradas en superficies SLA tratadas con plasma de argón eran más grandes. A partir de este resultado, se puede interpretar que este tratamiento mejora la superficie al favorecer una mayor propagación celular.

En cuanto a circularidad, se obtuvieron valores más bajos en los grupos de titanio V (GR5NT y GR5TR), con una mayor extensión y forma de husillo. Las células sembradas en titanio IV eran más redondas y, por lo tanto, estaban menos esparcidas por la superficie, lo que significa un mejor comportamiento celular en esta superficie. Se obtuvieron resultados similares por otros autores descontaminando la superficie con plasma de argón aplicado mediante microondas. En el estudio de Mi Seon y cols., se utilizó plasma de argón autodiseñado inducido por microondas. En resumen, este sistema consistía en una fuente de alimentación de magnetrón de 2,45 GHz (1 kW), un aplicador que incluía una sección de ajuste y la boquilla de cuarzo. El microondas se introdujo a través de una guía de onda de cobre WR-284 con dimensiones de sección transversal interna de 72 mm \times 24 mm. El plasma generado al final de una boquilla se formó por una interacción entre los altos campos eléctricos, que es generada por la fuente de alimentación de microondas, la abertura de la guía de onda y la boquilla de gas. La intensidad del campo eléctrico alrededor de la boquilla se calculó mediante una simulación de código de simulador de estructura de alta frecuencia (HFSS). El argón se utilizó como gas de trabajo para este sistema de plasma, que se eligió por su inercia, y el caudal de gas es de aproximadamente 100 min^{-1} a 8 kgf/cm^2 . Para evaluar la eficiencia del plasma en los discos Ti, los discos Ti se colocaron delante de una boquilla en el sistema de plasma y se expusieron al plasma durante 1 s, 5

s en "tratamiento corto (3 cm)" y 10 s, 30 s, 90 s en "tratamiento largo (7 cm)", respectivamente.

Las imágenes de fluorescencia de las células en los discos de titanio que visualizan la membrana plasmática mediante la tinción de maleimida roja de Texas han demostrado que las células adheridas en las muestras tratadas con plasma aumentaron en población y también obviamente se ampliaron. Las células que se adherían a discos no tratados eran más pequeñas y de forma redonda, mientras que las células de los discos tratados con plasma inducidos por microondas ocupaban un área de fijación más grande, una morfología alargada bien extendida con proyecciones formadas similares a lamelipodios. La población de células también aumentó después del tratamiento con plasma. Este resultado significa que la proporción de células inicialmente unidas aumentó después del tratamiento plasmático. Se observó que las células preosteoblásticas cultivadas en titanio tratado con superficie SLA eran mayores en número y área, mostrando más diseminación dentro de las células que aquellas cultivadas en superficies no tratadas en las que las células se veían más redondas y pequeñas.

Pistilli y cols. evaluaron la adsorción de proteínas y la adhesión celular en cuatro tipos de discos de titanio en los que se comparó el plasma de argón con un control. Se observó un aumento en los niveles de adsorción de proteínas y adhesión celular en todos los grupos tratados con plasma de argón, siendo aquellos discos con una superficie más rugosa en los que se observaron valores más altos.

Naujokat y cols. llevó a cabo un estudio in vivo en el que se prepararon superficies de implantes con plasma de argón durante cuatro minutos antes de la inserción en el hueso de cerdo. El plasma se describe como un gas parcialmente ionizado con iones, electrones

y partículas sin carga (átomos, moléculas y radicales). El plasma se puede diferenciar en dos tipos: plasma atmosférico térmico y no térmico (frío) (CAP), con una temperatura inferior a 40 °C en el punto de aplicación. Varios estudios *in vitro* demostraron que la humectabilidad y la propagación celular en las superficies de titanio se ven reforzadas por la modificación del plasma (184). Se reveló que el tratamiento plasmático conduce a un aumento de la proliferación celular, la propagación celular y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, y que las células similares a los osteoblastos forman redes más desarrolladas. Otro estudio señala que los osteoblastos muestran una mayor adherencia celular y resultados positivos en morfología celular en superficies de titanio condicionadas por plasma en comparación con las superficies no tratadas (185). no obstante, no se observaron cambios macroscópicos ni microscópicos después del tratamiento. La estabilidad primaria de los implantes no se vio afectada. Se investigaron los valores de contacto hueso-implante (BIC). Se encontraron valores de BIC y densidad ósea más altos en aquellos implantes que se habían preparado de antemano. Los autores afirmaron que esta técnica podría ser realizada de forma rutinaria por el especialista utilizando un dispositivo de plasma tipo pluma antes de insertar el implante, pero el efecto podría ser menor que con un método de cámara de argón.

En un estudio realizado por Annunziata y cols. (174), los resultados sugirieron que el tratamiento con plasma de argón podría usarse de manera eficiente para descontaminar superficies de implantes de titanio previamente infectadas. Estos resultados alentadores pueden extenderse a la descontaminación de las superficies de implantes infectadas, con el fin de estimular una respuesta favorable en los tejidos periimplantarios duros y blandos.

En el estudio realizado por Duske y cols., se investigó el potencial del plasma frío de argón complementado con oxígeno al 1% para el tratamiento de superficies rugosas de titanio contaminadas con biopelículas de placa. En implantología dental, el tratamiento exitoso de las lesiones periimplantarias sigue siendo uno de los mayores desafíos. La periimplantitis es un problema conocido y creciente en la odontología. La biopelícula, que se encuentra en el implante, causa inflamación del tejido que rodea el implante. La consecuencia es una pérdida ósea circunferencial, que puede comprometer la longevidad de un implante. Un metanálisis basado en 11 estudios mostró una prevalencia media de periimplantitis del 22 % y una relación positiva entre el tiempo de inserción y la prevalencia (186). Debido a la falta de previsibilidad de cualquier régimen terapéutico establecido, todavía no hay un implante generalmente aceptado que preserve el estándar dorado. La periimplantitis afecta a alrededor del 10 % de los implantes y al 20 % de los pacientes durante un período de observación de 5 a 10 años después de la colocación del implante y parece ser la principal causa biológica de fallo del implante a largo plazo. Los principales factores etiológicos de la periimplantitis son las biopelículas bacterianas en la superficie del implante. Por lo tanto, la piedra angular de cualquier terapia periimplantitis comprende la extracción mecánica de la biopelícula, que no debe cambiar la micromorfología de la superficie del implante. Los tratamientos mecánicos *in vitro* e *in vivo* con un dispositivo de abrasión de polvo de aire o con un cepillo de titanio dejaron alrededor del 10 % de residuos bacterianos en superficies de titanio con chorro de arena rugosa.

Además de estos residuos bacterianos, las propiedades fisicoquímicas de la superficie del implante parecían influir en la resolución de los espacios óseos alveolares alrededor de los implantes. Después de la instalación de implantes prístinos y vírgenes en

las cuencas de extracción, se llenaron por completo grandes huecos entre el implante recién instalado y el alveolo, posteriormente se produjo osteointegración. En contraste con esto, los huecos en el hueso causados por la periimplantitis inducida microbianamente no se curaron después del tratamiento mecánico de las superficies de los implantes expuestos. Ni el tratamiento antimicrobiano mecánico ni químico por sí solo conducen a una reoseintegración predecible de las superficies de los implantes inicialmente expuestas microbianamente. Para promover la reoseintegración, se postuló que, además, la superficie del implante contaminado tiene que ser "rejuvenecida". Sin embargo, para ello no hay un procedimiento definido disponible, que es descrito precisamente por Lindhe, que inventó el término "rejuvenecimiento".

Se indica que el tratamiento con plasma atmosférico frío (CAP) tiene el potencial de cambiar las propiedades fisicoquímicas de las superficies de los implantes en una dirección que apoye positivamente la reoseintegración. En general, la NAC (N-acetilcisteína) es un gas casi eléctricamente neutro y altamente ionizado compuesto de iones, electrones, átomos excitados y moléculas, así como partículas químicamente reactivas y neutras, y emite irradiación ultravioleta y ultravioleta al vacío. El plasma fue capaz de limpiar las superficies de titanio y disminuir el ángulo de contacto con el agua mediante el aumento de la hidrofilia superficial. Debido al aumento de la hidrofilia, la adhesión tisular y la propagación de las células osteoblásticas mejoraron después del tratamiento con plasma. Además, los experimentos con animales y humanos demostraron que, en principio, las superficies hidrófilas de titanio mejoraron la etapa temprana de la cicatrización de heridas de los tejidos blandos y duros en comparación con el titanio no tratado (ángulo de contacto $> 138^\circ$). Las superficies hidrófilas inducidas por plasma mostraron los mismos resultados en estudios de Beagle y conejo.

Dependiendo de la magnitud de la producción de energía, CAP podría inactivar y destruir bacterias o eliminar las biopelículas por completo. El dispositivo CAP utilizado fue capaz de matar bacterias, por un lado y promover la adhesión y propagación de osteoblastos, por otro. Para imitar una situación clínica en un experimento *in vitro*, primero hay que extraer biopelículas y luego cultivar osteoblastos en la superficie inicialmente expuesta microbianamente. Hasta ahora se dispone de información limitada sobre el comportamiento celular en superficies inicialmente contaminadas microbianamente y limpiadas consecutivamente con CAP. Para clasificar los resultados se incluyó el tratamiento con limpieza mecánica (cepillado). Ni un solo tratamiento con CAP (plasma atmosférico frío) ni un solo cepillado proporcionaron una superficie completamente descontaminada. En consecuencia, las células de osteoblastos no podrían desarrollarse normalmente en presencia de bacterias. Un tratamiento combinado de cepillado seguido de un tratamiento CAP condujo a una superficie limpia, lo que permitió que las células crecieran de manera comparable a las células del control estéril. Por tanto, el efecto antimicrobiano sinérgico de la aplicación combinada con cepillado y CAP parece ser una estrategia prometedora para descontaminar implantes con una superficie rugosa de titanio.

La justificación de la modificación de la superficie se centra en la interacción de los implantes con biofluidos, alterando positivamente la cascada de eventos que conduce a la curación ósea y a la interacción íntima con el dispositivo (187). Varias revisiones conducen a un consenso general de que tanto las superficies rugosas (sobre superficies torneadas lisas) como la química de las superficies (recubrimientos basados en Ca-P sobre superficies no recubiertas) favorecen la respuesta temprana del huésped al implante.

Sin embargo, en la mayoría de los casos, las combinaciones de textura y química que se sabe que aceleran la osteointegración son procesos patentados y no están disponibles para la comunidad dental. Un tratamiento superficial controlado por el operador (cirujano dental) económicamente viable, económicamente viable que mejore la respuesta del huésped a cualquier superficie del implante proporcionaría un mejor tratamiento a más pacientes.

Si bien los intentos anteriores de modificar las características de la superficie con dispositivos de plasma térmicos o de radiofrecuencia tuvieron éxito, funcionaron a altas temperaturas o a bajas presiones. Además, debido a que el equipo era caro y poco fiable, estos procesos cayeron en desgracia. Por el contrario, los plasmas no térmicos (NTP) despliegan la mayor parte de su energía para impulsar la química de "alta temperatura", lo que permite la activación/modificación de la superficie mientras funcionan a temperatura ambiente. A diferencia de la tecnología de radiofrecuencia anterior que requería bajas presiones, la innovación reciente ha escalado los generadores NTP de microplasma a dimensiones lo suficientemente pequeñas como para permitir un funcionamiento seguro y portátil en el entorno clínico a presión atmosférica, al tiempo que proporciona energía suficiente para generar aumentos significativos en la energía superficial.

La incorporación de especies reactivas y la limpieza de superficies pueden dar lugar a un aumento de los niveles de reactividad superficial y energía que podrían mejorar la integración de las superficies de implantes disponibles en el mercado. Los efectos biomecánicos de un tratamiento NTP basado en Ar, adecuado para su uso en el consultorio dental y aplicado inmediatamente antes de la implantación, en el carácter de

la superficie y la integración de un implante dental con una superficie texturizada, en un modelo de perro Beagle.

Una vez más, hay evidencia en un estudio realizado por Teixeira y cols. que el tratamiento de los implantes dentales con plasma de argón a temperatura ambiente puede producir mejoras sustanciales en la fijación biomecánica en las primeras etapas de la implantación, mejorando la osteointegración.

En un estudio de García y cols., Se llevaron a cabo varios procesos de limpieza que produjeron diferentes niveles de adhesión celular a las superficies de los pilares del implante. Desde una perspectiva descriptiva, los pilares de implantes limpiados con plasma de argón mostraron una mayor adhesión celular que el grupo de control (pilares disponibles comercialmente sin tratamiento adicional). El efecto del tratamiento con plasma de argón también se evaluó como influyente en la distribución de los tejidos blandos. El área ocupada por las células fue mayor en el grupo de plasma que en el grupo no tratado, con una diferencia estadísticamente significativa. Además, no hubo contaminación bacteriana en el 100% de los pilares del grupo descontaminado, mientras que en el grupo control, el 40% presentó contaminación superficial. Además, se tomó una biopsia de la encía alrededor de los pilares para estudiar la orientación y densidad de las fibras de colágeno, las del grupo de plasma tienen mayor densidad con predominio de fibras oblicuas.

En otro estudio, Canullo y cols. (185) sugirió que la eliminación de partículas orgánicas contaminantes de los implantes dentales de titanio utilizando plasma de argón puede permitir un mejor mantenimiento del nivel óseo en comparación con la limpieza con vapor durante cinco segundos. Se ha demostrado que el éxito de los implantes a largo

plazo está relacionado con la presencia de una barrera de tejidos blandos que impide la penetración bacteriana. La calidad de este accesorio mucoso está influenciado por las propiedades de los componentes del implante que se ponen en contacto con el tejido blando.

El impacto en los tejidos periimplantados del material a granel del pilar demostró ser controvertido por varias revisiones sistemáticas. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el hecho de que la composición química del material a granel suele ser significativamente diferente de lo que la superficie expresa en la interfaz con los tejidos vivos. De hecho, la presencia de contaminaciones en la superficie del implante y el envejecimiento del metal pueden alterar la microtopografía del pilar (188).

La presencia de contaminantes se demostró en la superficie del implante durante el proceso de fabricación industrial, así como, después de los procedimientos de personalización. Dichos desechos, presentes en la interfaz titanio/tejidos conectivos-huesos, minimizan la adhesión de los tejidos blandos e incluso podrían empeorar la influencia de la respuesta inflamatoria de los tejidos periimplantados. Al mismo tiempo, aunque se demostró solo en las superficies de los implantes, el envejecimiento del titanio podría afectar a la respuesta celular. En un estudio *in vitro*, los autores se centraron en si los métodos de almacenamiento adecuados y la fotofuncionalización UV tenían efectos sinérgicos en las propiedades biológicas de las superficies de titanio envejecidas.

Al mismo tiempo, la alteración de las características de la superficie del pilar físico (aumento de la energía superficial y, por lo tanto, hidrofilia) podría afectar positivamente a la respuesta temprana del tejido periimplantario.

Desde un punto de vista fisicoquímico, el tratamiento con plasma aumenta la energía superficial y, por lo tanto, reduce el ángulo de contacto que promueve la propagación de las células. Además, se demostró que el tratamiento con plasma activaba las superficies a nivel atómico y molecular, produciendo superficies hidrófilas y mejorando su humectabilidad. Se demostró que los procesos plasmáticos adecuados mejoran la modificación hidrófila de la superficie de la capa de óxido que interactúa con las proteínas y las células del tejido circundante.

Para prevenir estos efectos negativos, se han propuesto protocolos específicos (174). Sin embargo, se demostró que la limpieza completa de las superficies de titanio contaminadas era difícil y llevaba mucho tiempo. Se demostró que el plasma del proceso de limpieza de argón limpia eficazmente las superficies de titanio contaminadas en estudios *in vitro*, y elimina la contaminación orgánica de los metales interactuando con los componentes intrínsecos de los materiales y crea una superficie recién disponible para la interacción con las células. Además, se ha visto que el uso de plasma de argón era capaz de afectar a la cantidad de proteínas absorbidas en diferentes superficies, a pesar de la rugosidad o las características topográficas en las superficies de titanio. Sin embargo, todavía hay una falta de evidencia en la literatura sobre la relevancia clínica del procedimiento de limpieza de plasma en los pilares de los implantes dentales en estudios *in vivo*.

Se hizo evidente la importancia de utilizar implantes dentales limpios y estériles en la práctica clínica.

Podemos decir que luego de comparar superficies de titanio tratadas o no con argón plasma, se observaron cambios significativos en el comportamiento celular y por

tanto es necesario rechazar la hipótesis nula de igual respuesta celular. La viabilidad celular se incrementó en células cultivadas en superficies tratadas a las seis y 24 horas, alcanzando estabilidad en la viabilidad entre todos los grupos a las 48 horas debido a la confluencia celular. Por otro lado, el tamaño de célula fue mayor en aquellas células sembradas en superficies tratadas y generalmente con baja circularidad valores con respecto a los grupos no tratados, interpretándose como una mejor propagación celular en la superficie. En nuestro estudio, se realizó un ensayo para determinar el balance energético mitocondrial usando tinción JC-1 después de 24 horas de incubación. Este tipo de análisis ha sido realizado por otros autores en diferentes tipos de superficies de titanio. La actividad mitocondrial más alta se observó en el grupo de titanio V sin tratamiento con argón. Al comparar ambos grupos de titanio tratados con plasma de argón, las células sembradas en titanio IV mostraron una mayor actividad que en titanio V. Los resultados de la actividad energética mitocondrial deben analizarse junto con los resultados de las otras variables que aumentaron.

La comparación entre ambos tipos de titanio tratados con plasma de argón debe ser cautelosa. Los materiales son diferentes. Según nuestro estudio, GR5TR presentó un mejor comportamiento celular global con respecto a GR4TR. Como ambos materiales son adecuados para su uso en el campo de la implantología oral, hay estudios que muestran un mejor rendimiento a largo plazo en titanio de grado IV que en titanio de grado V, respectivamente. Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias entre estos tipos de titanio; por ello, sería interesante verificar estos resultados en estudios posteriores. Algunas limitaciones de este estudio podrían ser el número de muestras analizadas y la línea celular empleada. MG-63 es una línea celular tumoral y podría expresar un fenotipo heterogéneo progresivo debido al subcultivo continuo. Además,

podría mostrar una proliferación no fisiológica, sin reflejar todas las características fenotípicas de los osteoblastos primarios. Es por ello que la generalización de los datos aportados en este estudio debe tomarse con cautela, siendo el principal factor a destacar la mejora del comportamiento celular general tras el tratamiento con plasma de argón en las superficies de titanio.

Una de las limitaciones de este estudio fue el número de muestras analizadas y la línea celular utilizada, haber realizado las diferentes pruebas a 72, 96 y 120 horas; haberlo realizado en el titanio de grado VI, VII, IX, pero los datos de este estudio indican que el uso de plasma de argón como intervención para descontaminar las superficies de los implantes de titanio puede conducir a una mejora en el crecimiento, tamaño celular, propagación y actividad mitocondrial de las células MG-63 que las recubren.

Entre las líneas futuras de investigación podemos proponer ampliar las horas de estudio de las células MG-63; realizar el estudio en discos de titanio de grado VI, VII, y IX. Los estudios clínicos e in vitro futuros deberían corroborar estos resultados experimentales.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

En referencia al Objetivo Específico N°1:

Los discos de titanio V tratados con argón-plasma mostraron niveles más altos de adhesión celular y proliferación de células MG-63.

En referencia al Objetivo Específico N°2:

El titanio de grado IV es el tipo de titanio más utilizado y mostró una mejora en el comportamiento celular y un mayor tamaño de células en las superficies tratadas con plasma de argón.

En referencia al Objetivo Específico N°3:

Los discos de titanio V tratados con plasma de argón mostraron menor daño mitocondrial y un área celular más grande (μm^2) en comparación con el Grado V no tratado y titanio de grado IV (tratado o no).

En referencia al Objetivo General:

Al comparar el crecimiento de las células MG-63 en los diferentes grupos de estudio, concluimos que el tratamiento con plasma de argón mejora la cantidad y calidad de este, tanto en titanio grado IV como en titanio de V.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Exposito, M, Ardebili, Y, Worthington, H.V. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. In Cochrane Database of Systematic Reviews; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2014; Volume 7.
2. Baró, A.M, García, N, Miranda, R, Vázquez, L, Aparicio, C, Olivé, J, Lausmaa, J. Characterization of surface roughness in titanium dental implants measured with scanning tunnelling microscopy at atmospheric pressure. *Biomaterials*. 1986, 7, 463–466
3. Lütjering G, Williams J. C. *Titanium*. Springer Science & Business Media; 2013.
4. Long M, Rack H. J. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. *Biomaterials*. 1998;19(18):1621–1639.
5. Donachie M. J. *A Technical Guide: Titanium*. American Technical Publishers; 2000.
6. Keselowsky B, Collard D, García A. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003;66(2):247–259.
7. Naert I, Quirynen M, van Steenberghe D, Darius P. A six-year prosthodontic study of 509 consecutively inserted implants for the treatment of partial edentulism. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 1992;67(2):236–245
8. Jemt T, Johansson J. Implant treatment in the edentulous maxillae: a 15-year follow-up study on 76 consecutive patients provided with fixed prostheses. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2006;8(2):61–69.
9. Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Brånemark P, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 1990;5(4):347–359.
10. Becker W, Hujoel P, Becker B. E, Wohrle P. Dental implants in an aged population: evaluation of periodontal health, bone loss, implant survival, and quality of life. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2015;17:461–468.
11. Xuereb M, Camilleri J, Attard NJ. Systematic review of current dental implant coating materials and novel coating techniques. *Int J Prosthodont*. 2015;28:51–59.

12. Martini D, Fini M, Franchi M, Pasquale VD, Bacchelli B, Gamberini M. Detachment of titanium and fluorohydroxyapatite particles in unloaded endosseous implants. *Biomaterials*. 2003;24:1309–1316.
13. Strietzel R, Hosch A, Kalbfleisch H, Buch D. In vitro corrosion of titanium. *Biomaterials*. 1998;19:1495–1499.
14. Reclaru L, Meyer JM. Effects of fluorides on titanium and other dental alloys in dentistry. *Biomaterials*. 1998;19:85–92.
15. Schiff N, Grosogeat B, Lissac M, Dalard F. Influence of fluoride content and pH on the corrosion resistance of titanium and its alloys. *Biomaterials*. 2002;23:1995–2002.
16. Penarrieta-Juanito G, Sordi MB, Henriques B, Dotto MER, Teughels W, Silva FS. Surface damage of dental implant systems and ions release after exposure to fluoride and hydrogen peroxide. *J Periodontal Res*. 2018. 10.1111/jre.12603.
17. 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.
18. Olmedo DG, Paparella ML, Brandizzi D, Cabrini RL. Reactive lesions of peri-implant mucosa associated with titanium dental implants: a report of 2 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39:503–507.
19. Olmedo DG, Nalli G, Verdu S, Paparella ML, Cabrini RL. Exfoliative cytology and titanium dental implants: a pilot study. *J Periodontol*. 2013;84:78–83.
20. Penmetsa SLD, Shah R, Thomas R, Kumar ABT, Gayatri PSD, Mehta DS. Titanium particles in tissues from peri-implant mucositis: an exfoliative cytology-based pilot study. *J Indian Soc Periodontol*. 2017;21:192–194.
21. Wilson TG, Jr, Valderrama P, Burbano M, Blansett J, Levine R, Kessler H. Foreign bodies associated with peri-implantitis human biopsies. *J Periodontol*. 2015;86:9–15.
22. 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;27:1178–1186.
23. 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.

24. Addison O, Davenport AJ, Newport RJ, Kalra S, Monir M, Mosselmans JF. Do ‘passive’ medical titanium surfaces deteriorate in service in the absence of wear? *J R Soc Interface*. 2012;9:3161–3164.
25. Lim HP, Lee KM, Koh YI, Park SW. Allergic contact stomatitis caused by a titanium nitride-coated implant abutment: a clinical report. *J Prosthet Dent*. 2012;108:209–213.
26. Pigatto PD, Berti E, Spadari F, Bombeccari GP, Guzzi G. Photoletter to the editor: exfoliative cheilitis associated with titanium dental implants and mercury amalgam. *J Dermatol Case Rep*. 2011;5:89–90.
27. Bircher AJ, Stern WB. Allergic contact dermatitis from “titanium” spectacle frames. *Contact Dermatitis*. 2001;45:244–245.
28. Fage SW, Muris J, Jakobsen SS, Thyssen JP. Titanium: a review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. *Contact Dermatitis*. 2016;74:323–345.
29. Vijayaraghavan V, Sabane AV, Tejas K. Hypersensitivity to titanium: a less explored area of research. *J Indian Prosthodont Soc*. 2012;12:201–207.
30. Hosoki M, Nishigawa K, Miyamoto Y, Ohe G, Matsuka Y. Allergic contact dermatitis caused by titanium screws and dental implants. *J Prosthodont Res*. 2016;60:213–219.
31. Thomas P, Bandl WD, Maier S, Summer B, Przybilla B. Hypersensitivity to titanium osteosynthesis with impaired fracture healing, eczema, and T-cell hyperresponsiveness in vitro: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis*. 2006;55:199–202.
32. Lalor PA, Revell PA, Gray AB, Wright S, Railton GT, Freeman MA. Sensitivity to titanium. A cause of implant failure? *J Bone Joint Surg Br*. 1991;73:25–28.
33. Aksakal B., Yildirim Ö. S., Gul H. Metallurgical failure analysis of various implant materials used in orthopedic applications. *Journal of Failure Analysis and Prevention*. 2004;4(3):17–23.
34. Hansen D. C. Metal corrosion in the human body: the ultimate bio-corrosion scenario. *Interface*. 2008;17:31–34.
35. Eckert S. E., Meraw S. J., Cal E., Ow R. K. Analysis of incidence and associated factors with fractured implants: a retrospective study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 2000;15(5):662–667

36. Romeo E, Storelli S. Systematic review of the survival rate and the biological, technical, and aesthetic complications of fixed dental prostheses with cantilevers on implants reported in longitudinal studies with a mean of 5 years follow-up. *Clinical Oral Implants Research*. 2012;23(6):39–49.
37. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *Journal of Clinical Periodontology*. 2002;29(supplement 3):197–233.
38. Goodman S. B, Lind M, Song Y, Smith R. L. In vitro, in vivo, and tissue retrieval studies on particulate debris. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1998;352:25–34.
39. Huo M. H, Salvati E. A, Lieberman J. R., Betts F., Bansal M. Metallic debris in femoral endosteolysis in failed cemented total hip arthroplasties. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1992;(276):157–168.
40. Wang J. C, Yu W. D, Sandhu H. S, Betts F, Bhuta S, Delamarter R. B. Metal debris from titanium spinal implants. *Spine*. 1999;24(9):899–903.
41. Brien W. W, Salvati E. A, Betts F. Metal levels in cemented total hip arthroplasty: a comparison of well-fixed and loose implants. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 1992;(276):66–74.
42. Souza J. C, Henriques M, Oliveira R, Teughels W, Celis J.-P, Rocha L. A. Do oral biofilms influence the wear and corrosion behavior of titanium? *Biofouling*. 2010;26(4):471–478.
43. Kumazawa R, Watari F, Takashi N, Tanimura Y, Uo M, Totsuka Y. Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology. *Biomaterials*. 2002;23(17):3757–3764.
44. Haynes D. R, Rogers S. D, Hay S, Percy M. J, Howie D. W. The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. *The Journal of Bone & Joint Surgery—American Volume*. 1993;75:825–834.
45. Keegan G. M, Learmonth I. D, Case C. P. Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: a review of current knowledge and future

- strategies. *The Journal of Bone & Joint Surgery—British Volume*. 2007;89(5):567–573.
46. Rodríguez-Mercado J. J, Roldán-Reyes E, Altamirano-Lozano M. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology Letters*. 2003;144(3):359–369.
47. Léonard A, Lauwerys R. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of cobalt metal and cobalt compounds. *Mutation Research*. 1990;239(1):17–27.
48. Domingo J. L. Reproductive and developmental toxicity of aluminum: a review. *Neurotoxicology and Teratology*. 1995;17(4):515–521.
49. Catalani S, Stea S, Beraudi A. Vanadium release in whole blood, serum and urine of patients implanted with a titanium alloy hip prosthesis. *Clinical Toxicology*. 2013;51(7):550–556.
50. Huiskes R, Weinans H, Grootenboer H. J, Dalstra M, Fudala B, Slooff T. J. Adaptive bone-remodeling theory applied to prosthetic-design analysis. *Journal of Biomechanics*. 1987;20(11-12):1135–1150.
51. Frost H. M. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anatomical Record*. 1990;226(4):414–422.
52. Sumitomo N, Noritake K, Hattori T. Experiment study on fracture fixation with low rigidity titanium alloy: plate fixation of tibia fracture model in rabbit. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008;19(4):1581–1586
53. Gross T, Pahr D. H, Peyrin F, Zysset P. K. Mineral heterogeneity has a minor influence on the apparent elastic properties of human cancellous bone: a SR μ CT-based finite element study. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*. 2012;15(11):1137–1144.
54. Eisenbarth E, Velten D, Müller M, Thull R, Breme J. Biocompatibility of β -stabilizing elements of titanium alloys. *Biomaterials*. 2004;25(26):5705–5713.
55. Li Y, Yang C, Zhao H, Qu S, Li X, Li Y. New developments of ti-based alloys for biomedical applications. *Materials*. 2014;7(3):1709–1800.
56. Wen C. E, Mabuchi M, Yamada Y, Shimojima K, Chino Y, Asahina T. Processing of biocompatible porous Ti and Mg. *Scripta Materialia*. 2001;45(10):1147–1153.

57. Xue W, Krishna B. V, Bandyopadhyay A, Bose S. Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium. *Acta Biomaterialia*. 2007;3(6):1007–1018.
58. Hollander D. A, Von Walter M, Wirtz T. Structural, mechanical and in vitro characterization of individually structured Ti-6Al-4V produced by direct laser forming. *Biomaterials*. 2006;27(7):955–963.
59. Otsuki B, Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M., Kokubo T, Nakamura T. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials*. 2006;27(35):5892–5900.
60. Roberts A. P, Garboczi E. J. Elastic properties of model random three-dimensional open-cell solids. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 2002;50(1):33–55.
61. Ford C. M, Gibson L. J. Uniaxial strength asymmetry in cellular materials: an analytical model. *International Journal of Mechanical Sciences*. 1998;40(6):521–531.
62. Bastawros A.-F, Bart-Smith H, Evans A. G. Experimental analysis of deformation mechanisms in a closed-cell aluminum alloy foam. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 2000;48(2):301–322.
63. Ashby M. F, Evans A. G, Fleck N. A, Gibson L. J, Hutchinson J. W, Wadley H. N. G. (Library). *Metal Foams: A Design Guide*. 2000;54
64. Malinov S, Guo Z, Sha W, Wilson A. Differential scanning calorimetry study and computer modeling of $\beta \Rightarrow \alpha$ phase transformation in a Ti-6Al-4V alloy. *Metallurgical and Materials Transactions A*. 2001;32(4):879–887.
65. Zou C, Zhang E, Li M, Zeng S. Preparation, microstructure and mechanical properties of porous titanium sintered by Ti fibres. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008;19(1):401–405.
66. Roberts A. P, Garboczi E. J. Elastic moduli of model random three-dimensional closed-cell cellular solids. *Acta Materialia*. 2001;49(2):189–197.
67. Niu W, Gill S, Dong H, Bai C. A two-scale model for predicting elastic properties of porous titanium formed with space-holders. *Computational Materials Science*. 2010;50(1):172–178.

68. Jha N, Mondal D. P, Dutta Majumdar J, Badkul A, Jha A. K, Khare A. K. Highly porous open cell Ti-foam using NaCl as temporary space holder through powder metallurgy route. *Materials and Design*. 2013;47:810–819.
69. Chen Y. J, Feng B, Zhu Y. P, Weng J, Wang J. X, Lu X. Fabrication of porous titanium implants with biomechanical compatibility. *Materials Letters*. 2009;63(30):2659–2661.
70. Li D. S, Zhang Y. P, Ma X, Zhang X. P. Space-holder engineered porous NiTi shape memory alloys with improved pore characteristics and mechanical properties. *Journal of Alloys and Compounds*. 2009;474:1–5.
71. Saha M. C, Mahfuz H, Chakravarty U. K, Uddin M, Kabir M. E, Jeelani S. Effect of density, microstructure, and strain rate on compression behavior of polymeric foams. *Materials Science and Engineering A*. 2005;406(1-2):328–336.
72. Tuncer N, Arslan G, Maire E, Salvo L. Investigation of spacer size effect on architecture and mechanical properties of porous titanium. *Materials Science and Engineering A*. 2011;530(1):633–642.
73. Raj R. E, Daniel B. S. Structural and compressive property correlation of closed-cell aluminum foam. *Journal of Alloys and Compounds*. 2009;467(1-2):550–556.
74. Shen H, Li H, Brinson L. C. Effect of microstructural configurations on the mechanical responses of porous titanium: a numerical design of experiment analysis for orthopedic applications. *Mechanics of Materials*. 2008;40(9):708–720.
75. Nakai M, Niinomi M, Akahori T. Development of biomedical porous titanium filled with medical polymer by in-situ polymerization of monomer solution infiltrated into pores. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2010;3(1):41–50.
76. Bural C, Aktaş E, Deniz G, Ünlüçerçi Y, Kizilcan N, Bayraktar G. Effect of post-polymerization heat-treatments on degree of conversion, leaching residual MMA and in vitro cytotoxicity of autopolymerizing acrylic repair resin. *Dental Materials*. 2011;27(11):1135–1143.
77. Oh I.-H, Nomura N, Masahashi N, Hanada S. Mechanical properties of porous titanium compacts prepared by powder sintering. *Scripta Materialia*. 2003;49(12):1197–1202.

78. Kirmanidou Y, Sidira M, Drosou ME, Bennani V, Bakopoulou A, Tsouknidas A, Michailidis N, Michalakis K. New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2908570.
79. Xue P, Li Y, Li K, Zhang D, Zhou C. Superelasticity, corrosion resistance and biocompatibility of the Ti–19Zr–10Nb–1Fe alloy. *Materials Science and Engineering C.* 2015;50:179–186.
80. Sakaguchi N, Niinomi M, Akahori T, Takeda J, Toda H. Effect of Ta content on mechanical properties of Ti–30Nb–XTa–5Zr. *Materials Science and Engineering C.* 2005;25(3):370–376.
81. Zhou Y. L, Niinomi M, Akahori T. Effects of Ta content on Young's modulus and tensile properties of binary Ti–Ta alloys for biomedical applications. *Materials Science and Engineering A.* 2004;371(1-2):283–290.
82. Correa D, Vicente F, Donato T, Arana-Chavez V, Buzalaf M, Grandini C. The effect of the solute on the structure, selected mechanical properties, and biocompatibility of Ti-Zr system alloys for dental applications. *Materials Science and Engineering C.* 2014;34:354–359.
83. Pillai M, Akshaya T, Elakkiya V, Gopinathan J, Santosh K, Dinakar B, Bhattacharyya A., Selvakumar R. Egg shell membrane—a potential natural scaffold for human meniscal tissue engineering: an in vitro study. *RSC Adv* 2015; 5: 76019–76025.
84. Varkey A, Venugopal E, Sugumaran P, Janarthanan G, Pillai MM, Rajendran S, Bhattacharyya A. Impact of silk fibroin-based scaffold structures on human osteoblast MG63 cell attachment and proliferation. *Int J Nanomedicine.* 2015 Oct 1;10 Suppl 1(Suppl 1):43-51.
85. Wu X, Wang S. Regulating MC3T3-E1 cells on deformable poly (ϵ -caprolactone) honeycomb films prepared using a surfactant-free breath figure method in a water-miscible solvent. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2012 Sep 26;4(9):4966-75.
86. Soeken KL, Miller SA, Ernst E. Herbal medicines for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatology (Oxford).* 2003 May;42(5):652-9.
87. Clover J, Gowen M. Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone.* 1994 Nov-Dec;15(6):585-91.

88. Clover J, Gowen M. Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone*. 1994 Nov-Dec;15(6):585-91.
89. The glossary of prosthodontic terms. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 2005;94(1):10–92.
90. Puleo D, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*. 1999;20(23-24):2311–2321.
91. Thomsen P, Larsson C, Ericson L. E, Sennerby L, Lausmaa J, Kasemo B. Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium, and titanium. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1997;8(11):653–665.
92. Branemark R, Branemark P, Rydevik B, Myers RR. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *Journal of rehabilitation research and development*. 2001;38:175.
93. Lioubavina-Hack N, Lang NP, Karring T. Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Clinical oral implants research*. 2006;17:244–250.
94. Misch CE. *Contemporary Implant Dentistry*. *Implant Dentistry*. 1999;8:90
95. Das S, Dholam K, Gurav S, Bendale K, Ingle A, Mohanty B, Chaudhari P, Bellare JR. Accentuated osseointegration in osteogenic nanofibrous coated titanium implants. *Sci Rep*. 2019 Dec 9;9(1):17638.
96. Li WJ, Laurencin CT, Cateson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2002;60:613–621.
97. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental materials*. 2007;23:844–854.
98. Albrektsson T, Brånemark P-I, Eriksson A, Lindström J. The preformed autologous bone graft: An experimental study in the rabbit. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery*. 1978;12:215–223.
99. Bagno, A, Di Bello, C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2004, 15, 935–949.

100. Al-Nawas B, Hangen U, Duschner H, Krummenauer F, Wagner W. Turned, machined versus double-etched dental implants in vivo. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2007;9(2):71–78.
101. Kaur M, Singh K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Sep;102:844–862
102. Pinholt E. M. Brånemark and ITI dental implants in the human bone-grafted maxilla: a comparative evaluation. *Clinical Oral Implants Research*. 2003;14(5):584–592.
103. Gotfredsen K, Nimb L, Hjørting-Hansen E, Jensen J. S, Holmén A. Histomorphometric and removal torque analysis for TiO₂-blasted titanium implants. An experimental study on dogs. *Clinical Oral Implants Research*. 1992;3(2):77–84.
104. Boukari A, Francius G, Hemmerlé J. AFM force spectroscopy of the fibrinogen adsorption process onto dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2006;78(3):466–472.
105. Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Sewing A, Aref A, Roessler S. Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. *Journal of Biomedical Materials Research—Part B: Applied Biomaterials*. 2005;73(1):88–96.
106. Abdel-Haq J, Karabuda C. Z, Arisan V, Mutlu Z, Kürkçü M. Osseointegration and stability of a modified sand-blasted acid-etched implant: an experimental pilot study in sheep. *Clinical Oral Implants Research*. 2011;22(3):265–274.
107. Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research—Part B: Applied Biomaterials*. 2009;88(2):544–557.
108. Patel S, Butt A, Tao Q, Royhman D, Sukotjo C, Takoudis C. G. Novel functionalization of Ti-V alloy and Ti-II using atomic layer deposition for improved surface wettability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;115:280–285.
109. Karabuda Z, Abdel-Haq J, Arisan V. Stability, marginal bone loss and survival of standard and modified sand-blasted, acid-etched implants in bilateral edentulous spaces: a prospective 15-month evaluation. *Clinical Oral Implants Research*. 2011;22(8):840–849.

110. Balli B, Dikici T, Toparli M. Enhancement and Characterization of Titanium Surfaces with Sandblasting. *Mater. Metall. Eng.* 2015
111. Mendonça G, Mendonça D, Aragão F, Cooper L. Advancing dental implant surface technology from micron to nanotopography. *Biomaterials.* 2008;29:3822–3835.
112. Diomedede F, Marconi G, Cavalcanti M, Pizzicannella J, Pierdomenico S, Fonticoli L, Piattelli A, Trubiani O. VEGF/VEGF-R/RUNX2 upregulation in human periodontal ligament stem cells seeded on dual acid etched titanium disk. *Materials.* 2020;13:706.
113. Giner L, Mercadé M, Torrent S, Punset M, Pérez R, Delgado L, Gil F. Double acid etching treatment of dental implants for enhanced biological properties. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 2018;16:83–89.
114. Moroni A, Caja VL, Sabato C. Bone ingrowth analysis and interface evaluation of hydroxyapatite coated versus uncoated titanium porous bone implants[J] *J Mater Sci: Mater Med.* 1994;5(6/7):411–416.
115. Cunha A, Renz RP, Blando E. Osseointegration of atmospheric plasma-sprayed titanium implants: influence of the native oxide layer[J] *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(1):30–36.
116. Da Silva LLG, Ueda M, Silva MM. Corrosion behavior of Ti–6Al–4V alloy treated by plasma immersion ion implantation process[J] *Surf Coat Technol.* 2007;201(19/20):8136–8139.
117. Cao HL, Liu XY, Meng FH. Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects[J] *Biomaterials.* 2011;32(3):693–705.
118. Wan YZ, Raman S, He F. Surface modification of medical metals by ion implantation of silver and copper[J] *Vacuum.* 2007;81(9):1114–1118.
119. Unosson E, Rodriguez D, Welch K. Reactive combinatorial synthesis and characterization of a gradient Ag-Ti oxide thin film with antibacterial properties[J] *Acta Biomater.* 2015(11):503–510.
120. Xu LX, Leng YX, Zhou HF. Structure and hemocompatibility of titanium oxide films synthesized by continuous or pulsed DC magnetron sputtering [J] *Key Eng Mater.* 2005:288–289. 299–302.

121. Yan RZ, Hu M. Advances in titanium alloys for cranio maxillofacial hard tissue implantation [J] *J Liaoning Med Univ.* 2015;36(6):106–109.
122. Qin J, Yang DQ, Maher S. Micro and nano structured 3D printed titanium implants with a hydroxyapatite coating for improved osseointegration[J] *J Mater Chem B.* 2018;6(19):3136–3144.
123. Hu X, Xu RG, Yu XL. Enhanced antibacterial efficacy of selective laser melting titanium surface with nanophase calcium phosphate embedded to TiO₂ nanotubes[J] *Biomed Mater.* 2018;13(4):045015.
124. Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. *The Journal of Prosthetic Dentistry.* 1983;49(6):832–837
125. Liu X, Chu P, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering R: Reports.* 2004;47(3-4):49–121.
126. Sul Y.-T, Johansson C. B, Jeong Y, Albrektsson T. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. *Medical Engineering and Physics.* 2001;23(5):329–346.
127. Cui X, Kim H.-M, Kawashita M. Preparation of bioactive titania films on titanium metal via anodic oxidation. *Dental Materials.* 2009;25(1):80–86.
128. Yang B, Uchida M, Kim H.-M, Zhang X, Kokubo T. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment. *Biomaterials.* 2004;25(6):1003–1010.
129. Leinenbach C, Eifler D. Influence of oxidation treatment on fatigue and fatigue-induced damage of commercially pure titanium. *Acta Biomaterialia.* 2009;5(7):2810–2819.
130. Diamanti M, Spreafico F, Pedferri M. Production of anodic TiO₂ nanofilms and their characterization [J] *Physics Procedia.* 2013;40:4030–4037.
131. Yang B, Uchida M, Kim HM. Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment [J] *Biomaterials.* 2004;25(6):1003–1010.
132. Wu Q, Li J, Zhang W. Propiedad antibacteriana, actividad angiogénica y osteogénica del revestimiento de TiO₂ incorporado con Cu [J] *J Mater Chem B.* 2014; 2 (39): 6738-6748.

133. Zwilling V, Darque-Ceretti E, Boutry-Forveille. Structure and physicochemistry of anodic oxide films on titanium and TA6V alloy. *Surf Interf Anal.* 1999;27(7):629–637.
134. Gong D, Grimes C, Varghese O. Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation[J] *J Mater Res.* 2001;16(12):3331–3334.
135. Das K, Bose S, Bandyopadhyay A. Surface coatings for improvement of bone cell materials and antimicrobial activities of Ti implants[J] *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2008;87(2):455–460.
136. Park J, Bauer S, Pittrof A. Synergistic control of mesenchymal stem cell differentiation by nanoscale surface geometry and immobilized growth factors on TiO₂ nanotubes[J] *Small.* 2012;8(1):98–107.
137. Ribeiro AR, Oliveira F, Boldrini L. Micro-arc oxidation as a tool to develop multifunctional calcium-rich surfaces for dental implant applications[J] *Mater Sci Eng C.* 2015(54):196–206.
138. Du Q, Wei D, Wang Y. The effect of applied voltages on the structure, apatite-inducing ability and antibacterial ability of micro arc oxidation coating formed on titanium surface[J] *Bioact Mater.* 2018;3(4):426–433.
139. Li Y, Wang W, Liu H. Formation and in vitro/in vivo performance of “cortex-like” micro/nano-structured TiO₂ coatings on titanium by micro-arc oxidation[J] *Mater Sci Eng C.* 2018(87):90–103.
140. Wen C, Xu W, Hu W. Hydroxyapatite/titania sol-gel coatings on titanium-zirconium alloy for biomedical applications[J] *Acta Biomater.* 2007;3(3):403–410.
141. Olding T, Sayer M, Barrow D. Ceramic sol-gel composite coatings for electrical insulation[J] *Thin Solid Films.* 2001(398/399):581–586.
142. Nishio K, Neo M, Akiyama H. The effect of alkali- and heat-treated titanium and apatite-formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells[J] *J Biomed Mater Res.* 2000;52(4):652–661.
143. Zhang Y, Chen Y, Kou H. Enhanced bone healing in porous Ti implanted rabbit combining bioactive modification and mechanical stimulation[J] *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018(86):336–344.
144. Ban S, Iwaya Y, Kono H. Surface modification of titanium by etching in concentrated sulfuric acid[J] *Dent Mater.* 2006;22(12):1115–1120.

145. Creighton J, Ho P. Chemical Vapor Deposition. Chapter 1 2001. Introduction to chemical vapor deposition (CVD).
146. Ohring M. The Materials Science of Thin Films: Deposition and Structure. 2nd. New York, NY, USA: Academic Press; 1992.
147. Hayashi Y, Nakayama G. Corrosion behavior in subcritical and supercritical water containing sodium chloride. Corrosion Engineering, Science and Technology. 2002;31(6):491–494.
148. Hauert R, Falub C, Thorwarth G. Retrospective lifetime estimation of failed and explanted diamond-like carbon coated hip joint balls. Acta Biomaterialia. 2012;8(8):3170–3176.
149. Chandra L, Allen M, Butter R, Rushton N., Lettington A. H., Clyne T. W. The effect of biological fluids on the adhesion of diamond-like carbon films to metallic substrates. Diamond and Related Materials. 1995;4(5-6):852–856
150. Zhu Y, Wang W, Jia X, Akasaka T, Liao S, Watari F. Deposition of TiC film on titanium for abrasion resistant implant material by ion-enhanced triode plasma CVD. Applied Surface Science. 2012;262:156–158.
151. Kim H.-M, Himeno T, Kawashita M, Lee J.-H, Kokubo T, Nakamura T. Surface potential change in bioactive titanium metal during the process of apatite formation in simulated body fluid. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2003;67(4):1305–1309.
152. Tsukanaka M, Yamamoto K, Fujibayashi S. Evaluation of bioactivity of alkali- and heat-treated titanium using fluorescent mouse osteoblasts. Journal of Bone and Mineral Metabolism. 2013;32(6):660–670.
153. Tanaka M, Takemoto M, Fujibayashi S. Bone bonding ability of a chemically and thermally treated low elastic modulus Ti alloy: Gum metal. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2014;25(3):635–643.
154. Choi S, Murphy W. L. Sustained plasmid DNA release from dissolving mineral coatings. Acta Biomaterialia. 2010;6(9):3426–3435.
155. Yamaguchi S, Takadama H, Matsushita T, Nakamura T, Kokubo T. Preparation of bioactive Ti-15Zr-4Nb-4Ta alloy from HCl and heat treatments after an NaOH treatment. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2011;97(2):135–144.

156. Ao H, Xie Y, Tan H. Improved HMSC functions on titanium coatings by type I collagen immobilization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(1):204–214.
157. Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Bollati D, Rodriguez Y Baena R. Multifunctional implant surfaces: Surface characterization and bone response to acid-etched Ti implants surface-modified by fibrillar collagen I. *Journal of Biomedical Materials Research—Part A*. 2010;94(1):271–279.
158. Sverzut A, Crippa G, Morra M, De Oliveira P, Beloti M, Rosa A. Effects of type I collagen coating on titanium osseointegration: histomorphometric, cellular and molecular analyses. *Biomedical Materials*. 2012;7(3)
159. Korn P, Schulz M, Hintze V. Chondroitin sulfate and sulfated hyaluronan-containing collagen coatings of titanium implants influence peri-implant bone formation in a minipig model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(7):2334–2344.
160. Sartori M, Giavaresi G, Parrilli A. Collagen type I coating stimulates bone regeneration and osteointegration of titanium implants in the osteopenic rat. *International Orthopaedics*. 2015;39(10):2041–2052.
161. Yuan Z, Liu P, Hao YS. Construction of Ag-incorporated coating on Ti substrates for inhibited bacterial growth and enhanced osteoblast response[J] *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018(171):597–605.
162. Lin HY, Chen JH. Osteoblast differentiation and phenotype expressions on chitosan-coated Ti-6Al-4V[J] *Carbohydr Polym*. 2013;97(2):618–626.
163. Chen T, Wang S, He F. Promotion of osseointegration using Protamine/Alginate/Bone morphogenic protein 2 biofunctionalized composite coating on nanopolymorphic titanium surfaces[J] *J Biomedl Nanotechnol*. 2018;14(5):933–945.
164. Kazemzadeh-Narbat M, Kindrachuk J, Duan K. Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections[J] *Biomaterials*. 2010;31(36):9519–9526.
165. Timofeeva L, Kleshcheva N. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications[J] *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;89(3):475–492.

166. Cui XN, Murakami T, Tamura Y. Bacterial inhibition and osteoblast adhesion on Ti alloy surfaces modified by poly (PEGMA-r-phosmer) coating[J] ACS Appl Mater Interfaces. 2018;10(28):23674–23681.
167. Gollwitzer H, Ibrahim K, Meyer H, Mittelmeier W, Busch R, Stemberger A. Antibacterial poly (D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003;51(3):585–591.
168. Antoci V, Adams C, Hickok N, Shapiro I, Parvizi J. Antibiotics for local delivery systems cause skeletal cell toxicity in vitro. Clinical Orthopaedics and Related Research. 2007;(462):200–206.
169. Zhao L, Hu Y, Xu D, Cai K. Surface functionalization of titanium substrates with chitosan-lauric acid conjugate to enhance osteoblasts functions and inhibit bacteria adhesion. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2014;119:115–125
170. Jin G, Qin H, Cao H. Synergist effects of dual Zn/Ag ion implantation in osteogenic activity and antibacterial ability of titanium. Biomaterials. 2014;35(27):7699–7713.
171. Mombelli A, Décaillot F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. Journal of Clinical Periodontology. 2011;38(11):203–213.
172. Li Y, Xiong W, Zhang C. Enhanced osseointegration and antibacterial action of zinc-loaded titania-nanotube-coated titanium substrates: In vitro and in vivo studies. Journal of Biomedical Materials Research—Part A. 2013;102(11):3939–3950.
173. Komasa S, Kusumoto T, Hayashi R, Takao S, Li M, Yan S, Zeng Y, Yang Y, Hu H, Kobayashi Y, Agariguchi A, Nishida H, Hashimoto Y, Okazaki J. Effect of Argon-Based Atmospheric Pressure Plasma Treatment on Hard Tissue Formation on Titanium Surface. Int J Mol Sci. 2021 Jul 16;22(14):7617.
174. Annunziata M, Canullo L, Donnarumma G, Caputo P, Nastri L, Guida L. Bacterial inactivation/sterilization by argon plasma treatment on contaminated titanium implant surfaces: In vitro study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2016 Jan 1;21(1):e118-21.
175. Elakkiya V, Govindarajan R, Kannan K, Sujith Subash E, Amitava B, Selvakumar R. Stimulation of human osteoblast cells (MG63) proliferation using decanoic acid

- and isopropyl amine fractions of *Wattakaka volubilis* leaves, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2017; 69 (11), 1578–1591,
176. Clover J, Gowen M. Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone*. 1994 Nov-Dec;15(6):585-91.
177. Hayashi, R, Ueno, T, Migita, S, Tsutsumi, Y, Doi, H, Ogawa, T, Hanawa, T, Wakabayashi, N. Hydrocarbon deposition attenuates osteoblast activity on titanium. *J. Dent. Res.* 2014, 93, 698–703.
178. Roy M, Pompella A, Kubacki J, Szade J, Roy RA, Hedzelek W. Photofunctionalization of Titanium: An Alternative Explanation of Its Chemical-Physical Mechanism. *PLoS One*. 2016 Jun 16;11(6): e0157481.
179. Makoto H., Takayuki I., Yoshihiko S., Manabu I., Satoko H., Takahiro O. Impaired osteoblastic behavior and function on saliva-contaminated titanium and its restoration by UV treatment. *Materials Science and Engineering: C*, 2019; 100, 165-177.
180. Alves Jr, Guerra N, Morrais C, Hajek V. Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge. *Surface and coatings technology*, 2005; 194 (2-3), 196-202.
181. Anders H, Ralf S, Roman H, Ole T, Henning H, Max H, Claudio C, Clarissa P. Changes in surface characteristics of titanium and zirconia after surface treatment with ultraviolet light or non-thermal plasma.
182. Joana C, Deborah A, Naisandra B, Carlos E, Jana D, Juliana C, Clodomiro A, Silvia R. Effect of titanium Surface modified by plasma energy source on genotoxic response in vitro. 2009; 262 (2), 138-145.
183. Gyeong M, Hyok J, Soon Y, Mi H, Byeong-Ju K, Min S, Min-Ah K, Bong J, Jong-Chul P. Titanium surface modification by using microwave-induced argon plasma in various conditions to enhance osteoblast biocompatibility. *Biomaterials Research*, 2015; 19 (13).
184. Hendrik N, Sonke H, Lara Y, Jorg W, Christian F, Yahya A. Surface conditioning with cold argon plasma and its effect on the osseointegration dental implants in miniature pigs. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2019, 47 (3), 484-490.

-
185. Canullo, L, Genova, T, Wang H, Carossa S, Mussano F. Plasma of Argon Increases Cell Attachment and Bacterial Decontamination on Different Implant Surfaces. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2017, 32, 1315–1323.
186. Kathrin D, Lukasz J, Ina K, Rutger M, Birte H, Axel S, Barbara N, Thomas W, Klaus D, Thomas K. Cold atmospheric plasma in combination with mechanical treatment improves osteoblast growth on biofilm covered titanium discs. *Biomaterials*, 2015; 52, 327-334.
187. Hellen S, Charles M, Lukasz W, Amilcar F, Nelson S, Thomas L, Nick T, Malvin N, Paulo C. Assessment of a chair-side argon-bases non-thermal plasma treatment on the surface characteristics and integration of dental implants with textured surfaces. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2012; 9, 45-49.
188. Garcia B, Camacho F, Peñarrocha D, Tallarico M, Perez S, Canullo L. Influence of plasma cleaning procedure on the interaction between soft tissue and abutments: a randomized controlled histologic study. *Clinical Oral Implants Research*, 2016; 28 (10), 1269-1277.

ANEXOS