



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“EFECTO LOCAL Y SISTÉMICO DE LA CORROSIÓN DE
IMPLANTES DE TITANIO”**

TESISTA:

OD. DANIEL GUSTAVO OLMEDO

DIRECTOR:

PROF. DRA. MARÍA BEATRÍZ GUGLIELMONTI

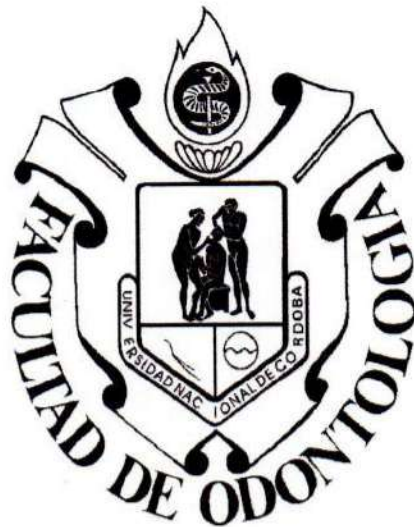
CÓRDOBA, 2001



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
CORDOBA**



T
D74
015
ejr
008446

FACULTAD DE ODONTOLOGIA



***EFECTO LOCAL Y SISTEMICO DE LA
CORROSION DE IMPLANTES DE TITANIO***

Trabajo de Tesis para optar al título de

Doctor en Odontología

Odontólogo Daniel Gustavo Olmedo

Año 2001

Director de Tesis
Profesora Doctora María Beatriz Guglielmotti

Profesora Adjunta Dedicación Exclusiva
Cátedra de Anatomía Patológica
Facultad de Odontología
Universidad de Buenos Aires
Investigadora Independiente CONICET
Especialista en Anatomía Patológica Bucal
Universidad de Buenos Aires

Asesor de Tesis
Doctor Rómulo Luis Cabrini

Profesor Emérito de la Universidad de Buenos Aires
Investigador Emérito de la Comisión Nacional de
Energía Atómica
Académico de Número de la
Academia Nacional de Medicina

Un viaje de mil millas comienza por el primer paso...

Lao Tsé

A mis sobrinos, Pablo e Ignacio

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos a todos los que, de alguna manera u otra, posibilitaron la realización de esta Tesis...por su guía, colaboración y acompañamiento ...

- A mi Directora de Tesis, Profesora Doctora María Beatriz Guglielmotti, por sus consejos, su constante y desinteresada presencia, por ser guía importante en mi formación científica, por su amistad y principalmente por confiar en mí...a Ella mi profundo agradecimiento.

- A mi asesor de Tesis, Profesor Doctor Rómulo Luis Cabrini, porque con sus continuas sugerencias, ideas, lineamientos y sobre todo con su sabiduría supo transmitirme su pasión por la ciencia y la investigación.

- A la Profesora Doctora Marta G. de Crosa, por su apoyo ilimitado, sus consejos, acompañamiento y la confianza depositada en mí. A Ella le debo mucho...

- A la Profesora Doctora María Elina Itoiz, Profesora Titular de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires, por abrirme desinteresadamente las puertas de su Cátedra, mi sincero reconocimiento.

- Al Profesor Doctor Gustavo Duffó y su equipo, de la División Corrosión del Departamento Materiales, Comisión Nacional de Energía Atómica por la realización de las técnicas electroquímicas y su permanente asesoramiento en temas de corrosión.

- A la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba, por su apoyo científico y económico, pilares importantes en la realización de este trabajo de Tesis.

- A mis compañeros de la Cátedra de Histología "A" de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba: Luis, Alicia, Rosita, Ada, Sebastián, Ana y Charo por el apoyo y acompañamiento durante este tiempo.

- Al Técnico de Laboratorio Víctor H. Tomasi, por su apoyo técnico y constante asesoramiento en las diferentes técnicas histológicas.

- A la Histotécnica Alicia Araoz, por la realización de los cortes histológicos en parafina.

- A mis compañeros del Laboratorio de Biomateriales de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires: Alejandro, Carlos, Diego, Graciela, María Marta, Myriam, Sandra y Corina, por su buena voluntad, disposición y apoyo incondicional.

- Al personal del Departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica, por brindarme su espacio.
- A las Doctoras M. Benyacar y M. Gallardo, del Laboratorio de Síntesis y Caracterización del Grupo Materia Condensada del Departamento de Física, Comisión Nacional de Energía Atómica, por la realización de los estudios cristalográficos.
- A las Doctoras M. Rosembush y M. Villegas, Comisión Nacional de Energía Atómica por la realización de parte de los estudios de microscopía electrónica de barrido y EDAX.
- A todo el personal docente y no docente de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires, por su hospitalidad y apoyo.
- A mis amigos: César, María Luisa, Pablo, Guadalupe y Erica... por su sincera amistad, entendimiento, por estar y acompañarme.
- A mi familia... especialmente a mis padres, porque gracias a Ellos, hoy puedo brindarles este trabajo.

A todos, mi noble reconocimiento ...

INDICE

	Páginas
• INTRODUCCION.....	1
• OBJETIVOS.....	13
• MATERIALES Y METODOS.....	14
• RESULTADOS.....	31
• DISCUSION.....	60
• CONCLUSIONES.....	74
• RESUMEN.....	77
• BIBLIOGRAFIA.....	79

INTRODUCCION

La utilización de biomateriales aumenta permanentemente en el campo biomédico en áreas tales como: cardiovascular, odontológica, ortopédica, oftalmológica, entre otras (1).

El descubrimiento de metales y aleaciones relativamente inertes ha determinado, en el área ortopédica y odontológica, la utilización de implantes metálicos cuyo uso se difunde día a día, dado que están cumpliendo con el requisito de sobrevivida a largo tiempo (2,3,4) a través de sus propiedades físico-químicas (5,6,7) y su compatibilidad con su entorno biológico (2,8,9).

Los egipcios fueron los primeros en utilizar alambre de oro para el reemplazo de dientes en la mandíbula (10). A comienzos del siglo XX, Greenfield reportó la implantación de un armazón circular de oro y platino como raíz dental artificial. En la primera mitad de este siglo Gershkoff y Goldberg, utilizaron implantes subperiósticos en aleación de cromo-cobalto (10). En 1947 Formaggini describió la colocación del implante endostal en forma de raíz, cuyo método fue mejorado por Chérchève en 1956 (11) y el sistema fue reconocido mundialmente. Roberts en 1967 diseñó un implante con forma laminar de acero inoxidable, denominado implante en forma de hoja. Linkow en 1968 (12) mejoró el diseño y desarrolló un sistema aceptable creando una amplia variedad de formas y tamaños. Sin embargo, no fue hasta fines de 1970 y principios de 1980 que el uso de implantes dentales de titanio definió una "nueva etapa", principalmente por el trabajo de Bränemark y co-autores en 1969 (13). Bränemark se encontraba realizando un estudio en conejos con la finalidad de evaluar microscópicamente la circulación sanguínea en el tejido óseo y

médula ósea, utilizando una cámara vital de titanio, la cual contenía un sistema óptico para transiluminación. Los investigadores observaron que la cámara luego de un período largo de tiempo estaba rodeada por tejido óseo. A partir de este hecho surgió el concepto de "oseointegración", el que fue definido por Bränemark como "una conexión estructural y funcional directa entre el hueso vivo ordenado y la superficie de un implante cargado" (14). El descubrimiento del titanio como material oseointegrable estableció una nueva era en la implantología. Hoy en día, los implantes intraóseos de titanio son usados como una alternativa terapéutica en rehabilitación tanto en el área ortopédica como para el reemplazo de dientes (15) y (16).

Aunque se tiene experiencia clínica en el manejo de implantes, los mecanismos biológicos básicos que se llevan a cabo en la interfase implante-tejido, no han sido aún completamente investigados y comprendidos (17). Cuando un implante es colocado dentro de los tejidos, se inicia un complejo proceso cicatrizal, influido por factores locales y sistémicos (18,19,20,21,22,23,24). La cicatrización no sólo está determinada por el estado y la capacidad de cicatrización del tejido receptor, sino también por las propiedades físicas y químicas del implante (5,6,7), y por la técnica quirúrgica. Por lo tanto deben considerarse las condiciones locales y sistémicas del huésped, el implante en si mismo y la técnica quirúrgica.

El implante en sí mismo puede, por ejemplo, influenciar y modular activa o pasivamente el proceso de cicatrización (25). Así las funciones del implante a corto o a largo plazo, son parcialmente dependientes de las propiedades del mismo, como ser: biocompatibilidad, diseño, características de superficie entre otras (2,6,26).

En cuanto a la biocompatibilidad Williams (27) la definió como el "estado de mutua coexistencia entre un biomaterial y el entorno biológico, sin ejercer ningún efecto indeseable uno sobre otro".

El material más utilizado en los implantes odontológicos y ortopédicos oseointegrados, es el titanio puro o en aleación. En el caso de los ortopédicos con la incorporación de cantidades muy pequeñas de vanadio y aluminio, que en ese caso son necesarios para llegar a condiciones mecánicas aceptables. Tradicionalmente la biocompatibilidad de un material de implante ha sido determinada por la evaluación de la reacción tisular local a tales materiales. Se ha reportado que los implantes intraóseos fabricados de titanio comercialmente puro (c.p) y aleaciones de titanio son bien tolerados por los tejidos, incluyendo el hueso (28). Asimismo varios estudios experimentales (2,13,17,29,30,31) y clínicos (32,33,34,35,36,37) focalizados en la respuesta del tejido óseo, han confirmado la biocompatibilidad del titanio.

El titanio es un material liviano, tiene una densidad de 4.5 g/cm^3 y pertenece al grupo 4^a en la Tabla periódica de los elementos, con un número atómico de 22 y peso atómico 47 (38).

En la fabricación de los implantes de titanio éste es sometido a un proceso de "mecanizado", esto determina que el metal quede expuesto al medio ambiente, a lubricantes y líquidos refrigerantes. Debido a que después de este proceso el metal no está en equilibrio termal con su entorno y que, en la mayoría de los casos, es capaz de disociar las moléculas de oxígeno en el aire, se formará en menos de un milisegundo una capa de óxido superior a 10 \AA en su superficie, y en un minuto la capa será del orden de 50 a 100 \AA (39).

El primer paso en la formación de dicha cubierta (óxido) es la absorción de las moléculas de O_2 que inmediatamente se disocian en átomos de O.

Las diferentes condiciones de maquinado inducen variaciones considerables en las propiedades de la capa de óxido (espesor, composición química, estructura de cristal, estequiometría, etc). Los pasos posteriores en la preparación del implante consisten en a) la limpieza ultrasónica con distintos solventes para remover completamente el aceite, huellas digitales, etc., y b) la pasivación del mismo en ácidos apropiados o con tratamientos electrolíticos para remover virutas o impurezas que pudieran haber quedado sobre la superficie del implante. Posteriormente se procede a la esterilización (39,40). Existen diferentes métodos de esterilización (autoclave, óxido de etileno, inmersión en esferas de vidrio, tratamiento glow discharge) (41).

La composición de la capa de óxido depende de las condiciones durante el proceso de oxidación y de los pasos posteriores durante la fabricación del implante (42).

El crecimiento de la capa de óxido se da por difusión de átomos/iones metálicos a través de la misma y su posterior oxidación, y/o por difusión de oxígeno en la superficie de óxido hacia la interfase metal óxido.

El espesor real, composición y microestructura del óxido dependerá de varios factores, incluyendo la presión y velocidad de maquinado, quienes determinan la temperatura superficial. El crecimiento del óxido aumentará en ritmo y espesor si el transporte del átomo de oxígeno y/o metal se acelera, por ejemplo, por un aumento de la temperatura o por la presencia de impurezas (42).

Durante la limpieza ultrasónica y esterilización del implante se modificará el óxido de superficie inicial. Especialmente durante el proceso de esterilización en autoclave donde se describe que el espesor aumentará ligeramente por la temperatura elevada y la atmósfera húmeda probablemente con la incorporación de radicales OH en el óxido (42).

La capa de óxido es altamente protectora y evita un contacto directo entre el medio ambiente y el metal en sí. Es decir entonces que nunca se establece un contacto entre el metal titanio o su aleación y el tejido receptor, sino entre el tejido y el óxido de superficie del implante. En tal sentido, los implantes de titanio se comportan como óxidos de titanio y las propiedades químicas del implante en la interfase implante-tejido, están dadas por la capa de óxido y no por el metal en sí mismo. Es la capa de óxido la que determina la respuesta biológica. Al seleccionar un metal apropiado como material de implante debería obtenerse la combinación ideal de un núcleo mecánicamente fuerte (el metal) y un fino recubrimiento de superficie bioquímicamente ventajoso (óxido) (39,43).

El óxido de titanio puede presentar diferentes relaciones estequiométricas: monóxido de titanio (TiO), trióxido de titanio (Ti_2O_3), dióxido de titanio (TiO_2), de los cuales el TiO_2 es el más común. El TiO_2 puede tener tres estructuras de cristal diferentes: rutilo, anatasa y brookita, pero también puede ser amorfo.

El dióxido de titanio es clasificado como un cerámico. Las características de los cerámicos son su gran dureza, pero gran fragilidad, buenas propiedades a alta temperatura e inercia química. No son tan fuertes ni ventajosos mecánicamente como los metales (42). Esto implica que el implante de titanio debería ser considerado como cerámico, no como un metal en sí.

El espesor de la capa de óxido se estima que se encuentra en el orden de los de 50Å previa a la implantación. Con el tiempo, esta capa aumenta "in vivo" superando los 2000 Å (44) junto con la incorporación de calcio, fósforo y sulfuro.

Los fabricantes de los diferentes sistemas de implantes tratan de lograr un adecuado diseño y que la composición de los mismos aseguren una mínima degradación, corrosión, disolución, deformación y fractura, entre otras condiciones.

Datos experimentales han demostrado que en una primera etapa puede haber una excelente oseointegración pero que posteriormente, factores intrínsecos a los materiales del implante o su entorno, son capaces de desarrollar una pérdida de la misma (45,46).

Dentro de las posibles causas de fracaso en un implante después de haber tenido un éxito inicial, la corrosión ocupa un destacado lugar. Conceptualmente la corrosión es el deterioro que sufre un metal debido al medio que lo rodea y que produce como consecuencia la liberación de iones (47). La introducción de un implante metálico dentro de los tejidos probablemente causará una corriente eléctrica a causa del medio electrolítico, especialmente por la presencia de NaCl y oxígeno que están presentes en los fluidos corporales. Este proceso puede aumentar la liberación de sustancias desde el metal y aleaciones metálicas, que pueden ser perjudiciales para el microambiente. Existen metales denominados "nobles" cuya resistencia a la corrosión es debida a la alta estabilidad termodinámica, ejemplos de tales metales son el rodio (Rd), paladio (Pd), iridio (Ir) y el platino (Pt). Los metales no nobles, al contrario, no son termodinámicamente estables y su resistencia a la corrosión es debida a la

formación de la capa protectora de óxido sobre su superficie. Ejemplos de ellos son el titanio (Ti), vanadio (V), zirconio (Zr), niobio (Nb) y tantalio (Ta) (48).

La excelente biocompatibilidad del titanio se explica principalmente por la capacidad de formar en su superficie esa "película de óxido" la cual lo hace extremadamente resistente a la corrosión (38). La corrosión sugiere la posibilidad de disolución de la capa de óxido protectora, lo cual puede ser un severo problema para los materiales utilizados en implantología. Esto parece ser un proceso muy lento con el titanio, probablemente debido a la alta estabilidad de su óxido. Sin embargo, factores del entorno, por ejemplo alteraciones de pH, pueden modificar seriamente esta condición. Por lo tanto, son necesarias mediciones cuantitativas de la tasa de corrosión. La corrosión puede aparecer cuando la capa de óxido es dañada por abrasión durante la colocación del implante o bajo carga funcional. Se ha descrito que la capa de óxido está compuesta de agujas de óxido de titanio, que se extienden fuera de los límites normales de la capa de óxido (7). Estas agujas de óxido pueden ser quebradas en el momento de la cirugía durante la colocación del implante y posiblemente disueltas en los fluidos orgánicos. Esto podría explicar los iones de titanio encontrados algunas veces adyacentes a los implantes de titanio (7). Existen estudios que apoyan el concepto de que partículas de titanio pueden ser liberadas desde el implante durante la preparación del lecho y la colocación del implante (49). Meachin y Williams reportaron que los fluidos orgánicos eran los responsables de la disolución del metal o su capa pasiva de óxido (50). Woodman y colaboradores (51) mostraron una fuerte correlación entre superficie-área y la liberación de iones.



La evidencia de la corrosión en la superficie de los implantes, ha sido descrita por Luthy (52) al analizar implantes fracasados "exfoliados". Lemons (53,54) y Adell y colaboradores (55) han considerado la importancia de monitorear en forma continua la corrosión de los implantes. Una efectiva aleación para uso en implantología sería aquella cuya superficie no solo forme una capa de óxido pasiva que resista los procesos que guían a la ruptura, sino también que sea capaz de repasivarse, es decir de formar una nueva capa de óxido, con una velocidad suficientemente alta para que una vez que la ruptura ha ocurrido, la exposición del metal al medio ambiente sea mínima (56).

Se ha demostrado que la reparación "in vitro" de la capa de óxido experimentalmente dañada tarda alrededor de 8 horas en soluciones similares a los fluidos fisiológicos del cuerpo (57). Este proceso de repasivación ocurre espontáneamente, aún en soluciones libres de oxígeno, por el uso del oxígeno proveniente de las moléculas de agua.

La necesidad de asegurar una mínima corrosión es un factor importante que incide en la selección de metales y aleaciones que serán utilizados en organismos vivos como estructuras protésicas.

Los procesos de corrosión de los metales pueden ser clasificados para su estudio según el medio en que se desarrollan o según su morfología. En tal sentido Galvele y Duffó (58) los clasifican: 1) según el medio: a-Corrosión química y b- Corrosión electroquímica ; 2) según la forma: a- Corrosión uniforme y b- Corrosión localizada (Corrosión en placas, picado, rendijas, intergranular).

Se han descrito dos reacciones electroquímicas cuando los metales se corroen: una reacción de oxidación en el ánodo y una reacción de reducción en

el cátodo. Cuando estas reacciones ocurren en un implante colocado en un tejido, los iones metálicos pueden ser liberados desde el implante hacia los tejidos circundantes y órganos distantes (7,38,50,59,60,61,62). Aún cuando el titanio c.p. y aleaciones de titanio utilizadas para implantes son resistentes a la corrosión, puede ocurrir algún intercambio de iones metálicos dentro de los tejidos o fluidos tisulares (38). Esto podría suceder por difusión de iones a través de la capa pasiva de óxido, por áreas localizadas de micro-picado, desgaste macroscópico, o por el microdesgaste de agujas de óxido (7).

Hay datos que aseguran que los iones de titanio pasan a los tejidos circundantes y que llegan al medio interno para ser excretados por la orina (63). Galante (63) estudió prótesis coxofemorales oseointegradas fabricadas con titanio 90%-aluminio 6%-vanadio 4% , demostrando que iones de los tres metales mencionados pasan al plasma y son excretados por la orina.

R.M Urban et al detectó en 27 autopsias la presencia de partículas metálicas y plásticas provenientes de prótesis coxofemorales y de reemplazo de rodilla en órganos como hígado, bazo, ganglios linfáticos (64). La respuesta de los tejidos peri-implantarios a la liberación de iones es generalmente a corto término, mientras que la acumulación de iones en tejidos más remotos, tales como hígado, riñón y sangre, puede requerir más tiempo.

Hasta donde llegan los conocimientos actuales, parecería que la concentración de estos iones en condiciones normales está alejada de efectos tóxicos, pero abre un interrogante respecto a cual sería el efecto en períodos largos. Para ello es importante extender estos estudios a situaciones patológicas, en particular a las que conducen a modificaciones locales, especialmente

descensos de pH, que pueden originar el rechazo de biomateriales utilizados en la fabricación de prótesis.

Se ha sugerido que iones liberados desde la superficie del implante contribuyen a la osteolisis (65) y otras alteraciones (66). La liberación de iones puede alterar la mineralización del hueso. Varios estudios "in vitro" e "in vivo" han demostrado alteraciones en la mineralización principalmente debida a iones metálicos de aluminio. Goodman (67) estudió esta situación. Este concluyó que: 1) la administración de aluminio en animales puede inducir osteomalacia en un hueso normal; 2) la exposición a aluminio perjudica la síntesis de matriz ósea; 3) la respuesta ósea puede estar mediada por un efecto tóxico del aluminio sobre el osteoblasto. El aluminio puede competir con el calcio durante el proceso de mineralización. El titanio y el vanadio en altas concentraciones pueden tener tendencia a inhibir la tasa de crecimiento de los cristales de hidroxiapatita (68).

Un tema de permanente interés, es la participación celular en la zona donde probablemente se está desarrollando un proceso de corrosión. Cuando un implante es colocado y se oseointegra, una considerable área de la superficie del implante puede estar inicialmente en íntimo contacto con la médula ósea (69). Los iones metálicos cuando pasan al medio biológico pueden quedar libres en los espacios intercelulares, pero también puede haber una activa participación de las células, en particular los macrófagos cuya función es la eliminación de todo elemento que produzca un deterioro o bien que pueda considerarse extraño en sí. Una respuesta celular de especial importancia es la formación de macrófagos que atesoran los elementos metálicos de alguna manera.

Las reacciones celulares y moleculares de la médula ósea ante el titanio no son bien conocidas. Las células en la interfase médula-implante, pueden estar directamente expuestas a iones o partículas liberadas desde la superficie del implante. Este proceso podría guiar al desarrollo de una irritación local crónica (38).

La degradación "in situ" de un implante metálico es un hecho no deseable por dos razones fundamentales: el proceso de corrosión puede alterar la integridad estructural del implante, y la liberación de productos de degradación puede causar una reacción biológica adversa en el huésped a nivel local y/o a distancia. La degradación puede ser resultado de un fenómeno de disolución electroquímica, desgaste o una combinación de ambos procesos.

Bessho y colaboradores (70), en un trabajo experimental en conejos, encontraron que a los 24 meses post-implantación de miniplacas de titanio, se desarrolla un tipo de corrosión localizada llamada corrosión por picado. El uso de miniplacas de titanio es de aplicación clínica en humanos en fracturas de maxilares y en otros huesos. Es de destacar, que la corrosión por picado es la que produce mayor deterioro en el titanio y otros metales, dado que el picado se localiza en puntos aislados de las superficies metálicas pasivas, propagándose al interior del metal. Este tipo de corrosión se puede obtener aplicando métodos electroquímicos. La ventaja de esta metodología es la posibilidad de obtener, a través de ensayos de corta duración, alteraciones en el metal que se producen a largo plazo.

El titanio, empleado en la fabricación de implantes, presenta una velocidad de disolución extremadamente baja, este hecho determina por un lado que actúe como factor desencadenante de fracasos mediatos, resultando en una cascada

de eventos que lleven a la pérdida ósea y al fracaso del implante y por el otro al pasaje de iones metálicos a nivel sistémico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta tisular por el efecto de la corrosión del titanio.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar modelos experimentales "*in vitro*" e "*in vivo*" para el estudio de la corrosión.
- Estudiar la respuesta local por el efecto de la corrosión en el microentorno peri-implante.
- Estudiar la respuesta sistémica por el efecto de subproductos de corrosión.
- Estudiar la implicancia de la corrosión mediante el análisis de implantes dentales humanos fracasados.
- Transferir los resultados a situaciones comparables con las posibles alteraciones de los implantes metálicos de larga data en humanos a los fines de proponer pautas de interés en los aspectos clínicos de la implantología.

MATERIALES Y METODOS

Estudio de la respuesta local ante el efecto de la corrosión por picado de implantes de titanio. Modelo Experimental.

Para el estudio de la respuesta biológica se utilizó el modelo experimental del "laminar test" descrito por Cabrini y colaboradores (71). Este método tiene la particularidad que la lámina metálica es introducida en plena médula ósea hematopoyética con capacidad osteogénica, donde no hay tejido óseo de ninguna naturaleza. Por lo tanto el tejido óseo encontrado es producido *de novo* como repuesta ante un material biocompatible.

Animales de experimentación:

Se utilizaron 20 ratas Wistar macho de aproximadamente 90 gramos de peso corporal. Los animales fueron alimentados *ad libitum*. Se siguieron las directivas del National Institute of Health (NIH) para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NIH Publication No 85-23, Rev. 1985).

Obtención de los implantes laminares (controles y experimentales)

Se utilizó una lámina de titanio (titanio grado 2) proveniente de la sección Corrosión del Departamento de Materiales de la Comisión Nacional de Energía Atómica, de aproximadamente 5x3x0.1cm . La muestra fue dividida en dos partes iguales. Una de las partes se utilizó para la obtención de los implantes laminares controles (Fig. 1a). El metal fue tratado con acetona para análisis ACS (Merck Química Argentina S.A.I.C.) durante 2 minutos bajo agitación magnética (Rocca S.A.-Argentina). Se obtuvieron 20 muestras de aproximadamente 6x1x0.1 mm (**implante laminar de titanio control**), las que

fueron nuevamente desengrasadas con acetona y se almacenaron en frascos de vidrio *ad-hoc* hasta su uso.

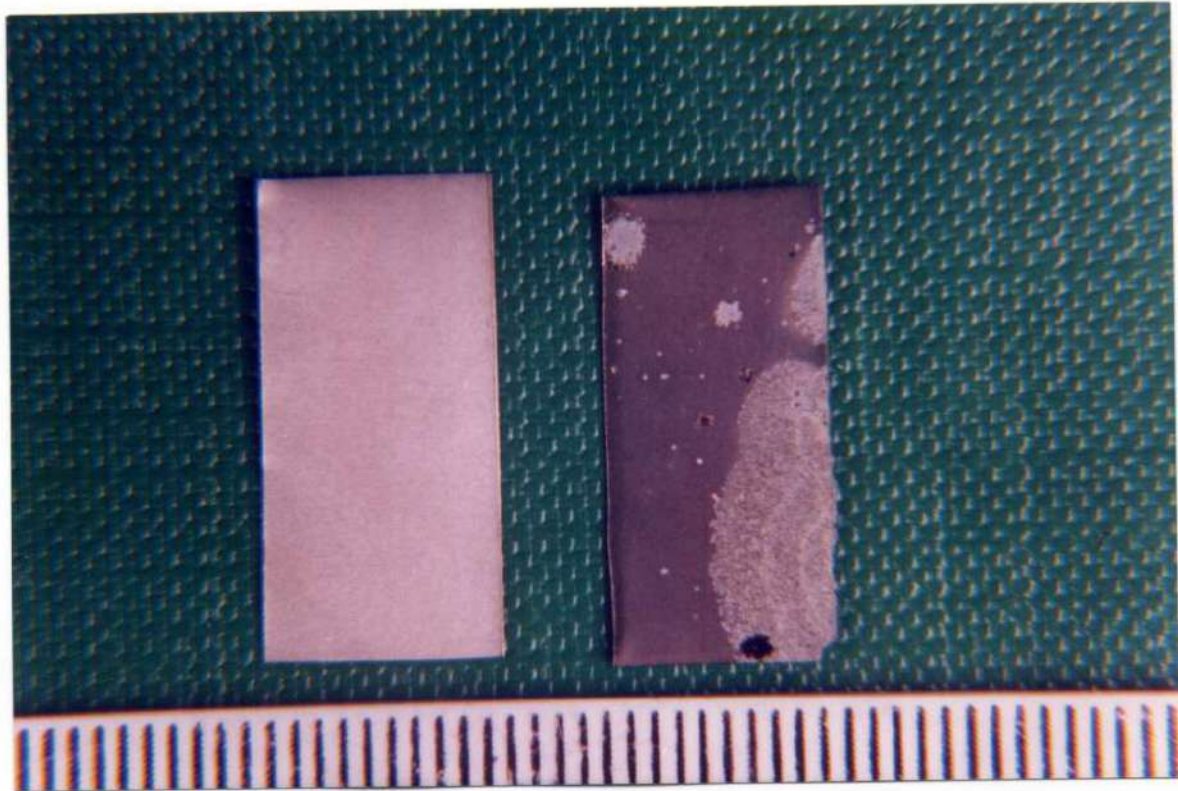


Fig. 1 a) Lámina de titanio a partir de la cual se obtuvieron los implantes laminares controles.

b) Lámina de titanio sometida a corrosión por picado a partir de la cual se obtuvieron los implantes laminares experimentales. Obsérvese la presencia de picaduras en la superficie.

La otra mitad de la lámina de titanio fue utilizada para obtener los implantes laminares con corrosión por picado (Fig. 1b). El metal fue desengrasado con acetona, con las mismas especificaciones expresadas anteriormente, y colocado en una celda electrolítica con una solución de cloruro de sodio 1 molar, a 15 voltios durante 1 minuto. De esta manera se obtuvieron picaduras que en algunos casos atravesaban la probeta utilizada. El procedimiento fue realizado en la Sección Corrosión del Departamento de Materiales de la Comisión Nacional de Energía Atómica. A partir de esta muestra se obtuvieron 20 láminas de aproximadamente 6x1x0.1mm (**implante laminar de titanio con**

corrosión por picado), que se almacenaron en frascos de vidrio *ad-hoc* hasta su uso.

Preparación de las muestras para su estudio por Microscopía Electrónica de Barrido y Análisis de rayos X por dispersión de energía (EDAX)

Las superficies de las láminas fueron analizadas por medio de Microscopio electrónico de barrido y por análisis de rayos X por dispersión de energía (EDAX) mediante un microscopio Philips SEM 500, Servicio de Microscopía, Departamento de Materiales de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Procedimiento quirúrgico

Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con una solución de 8 mg de Clorhidrato de Ketamina (Fort Dodge® - Argentina) y 1.28 mg de Xylazina (Bayer Argentina S.A.) cada 100 g de peso corporal. Ambas tibias fueron rasuradas en la zona de la cresta tibial con rasuradora eléctrica, y se realizó una incisión de aproximadamente 1.5cm a nivel de la misma con hoja de bisturí Bard-Parker número 15 (Fig. 2a).



Fig. 2a: Técnica quirúrgica. Previo rasurado de la tibia, se realiza una incisión a nivel de la cresta tibial.

El tejido celular subcutáneo, músculos y ligamentos fueron disecados con el fin de exponer la cara lateral externa de la tibia en el área diafisiaria (Fig. 2b). Con una fresa redonda se realizó una perforación de aproximadamente 1.5 mm de diámetro por rotación manual para prevenir sobrecalentamiento del tejido óseo y posterior necrosis.

En la tibia derecha de la rata (grupo experimental) se introdujo en la médula ósea hematopoyética un **implante laminar de titanio con corrosión por picado**. En la tibia izquierda (grupo control) se colocó un **implante laminar de titanio control** (Fig. 2c). Se procedió a realizar la sutura a puntos separados (Fig. 2d). No se administró antibióticoterapia. A los 14 días post-implante, los animales fueron sacrificados por sobredosis de éter, las tibias se resecaron, se fijaron en formol, y radiografiaron (Fig. 3).



Fig. 2b: Obsérvese la cara lateral externa de la tibia en el área diafisaria luego que el tejido celular subcutáneo, músculos y ligamentos fueron disecados.

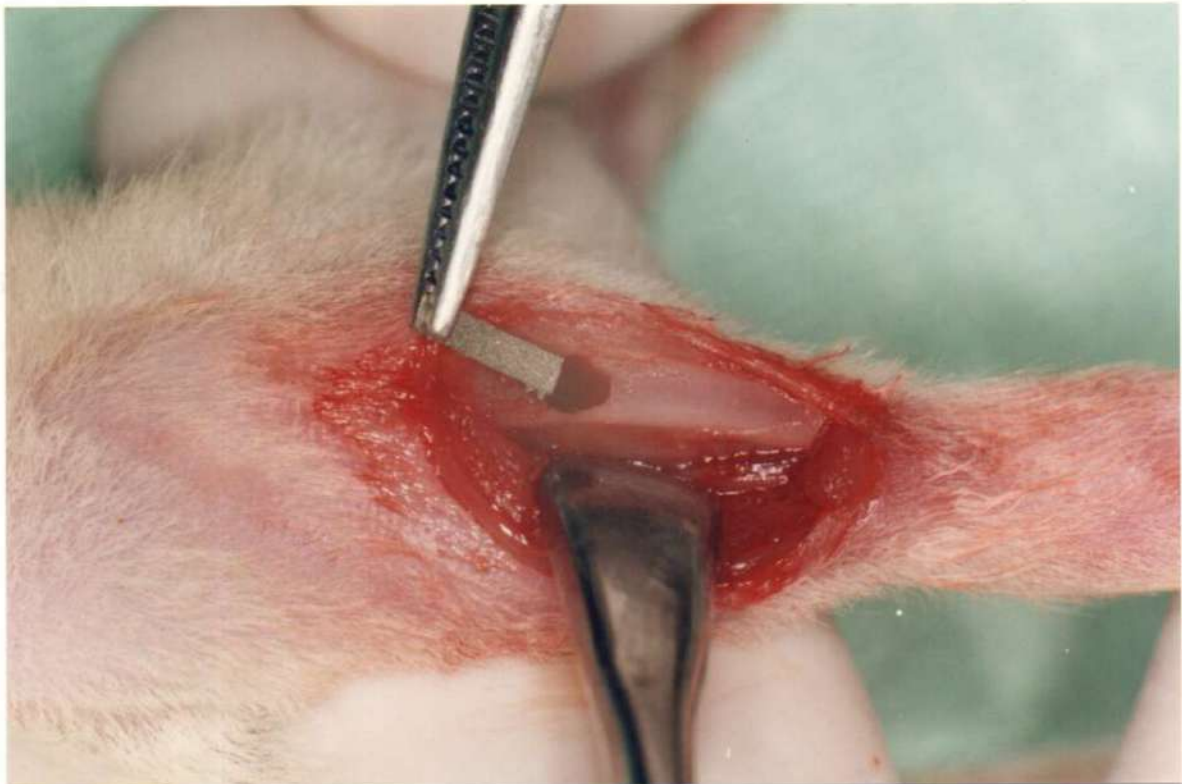


Fig. 2c: Previa perforación manual de la tibia con una fresa redonda, se introduce el implante laminar a través de la misma en la médula ósea hematopoyética.



Fig. 2d: Reposición de los tejidos y realización de sutura a puntos separados.



Fig. 3: Radiografía de tibia (frente y perfil) donde se observa el implante laminar de titanio en plena médula ósea hematopoyética.

Procesamiento histológico

Las tibias fueron procesadas para su posterior inclusión en metacrilato de metilo. Las tibias incluídas en metacrilato de metilo fueron seccionadas con una sierra en forma manual a nivel del implante metálico, obteniéndose tres cortes perpendiculares al eje mayor de la tibia (Fig. 4a-b).

Las muestras fueron tratadas con la técnica por desgaste utilizando en primer lugar una máquina para pulido de lentes para óptica (Silmar Productos Opticos - Argentina) y terminadas con lijas al agua AX-51 000 y glicerina, para un adecuado terminado superficial. Se obtuvieron cortes de aproximadamente 50 micrómetros de espesor. Los mismos fueron coloreados con la técnica de azul de toluidina – borato de sodio 1%, y fijados con molibdato de amonio al 5%.

El montaje se realizó con glicerina para análisis (Merk Química Argentina S.A.I.C.).



Fig. 4a: Tibia incluida en metacrilato de metilo. Las líneas indican los planos de corte para la obtención de 3 muestras para cada caso.

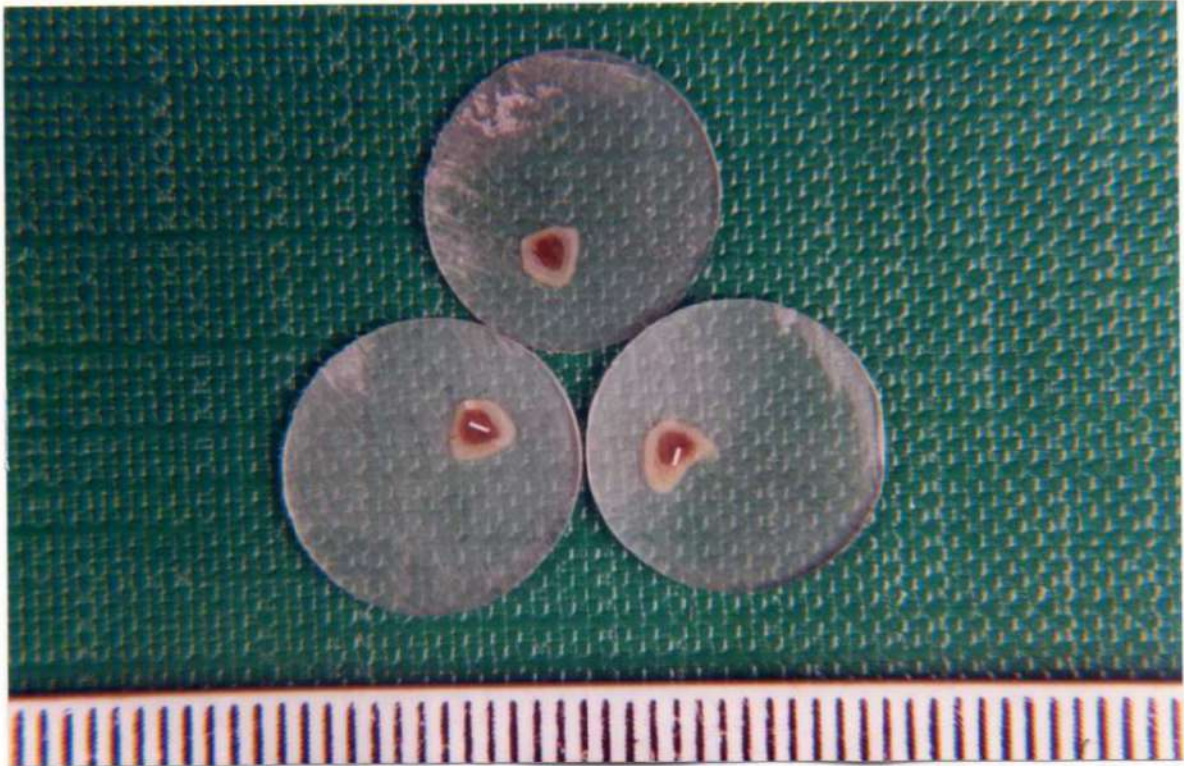


Fig. 4b: Muestras obtenidas luego del corte. Se observa claramente la tibia incluida en metacrilato de metilo.

Preparación de los cortes histológicos para el estudio por EDAX

La presencia de subproductos de corrosión en el lecho periimplantario fue estudiada por EDAX, mediante un microscopio Philips SEM 500, Servicio de Microscopía, Departamento de Materiales de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Análisis histomorfométrico

Los cortes histológicos fueron colocados en un microscopio óptico provisto con un prisma de reflexión total que proyecta la imagen magnificada sobre una tabla de dibujo. El implante y el tejido óseo fueron reproducidos sobre papel de dibujo a una magnificación final de X160, obteniéndose de esta manera proyecciones de las muestras (Fig. 5).

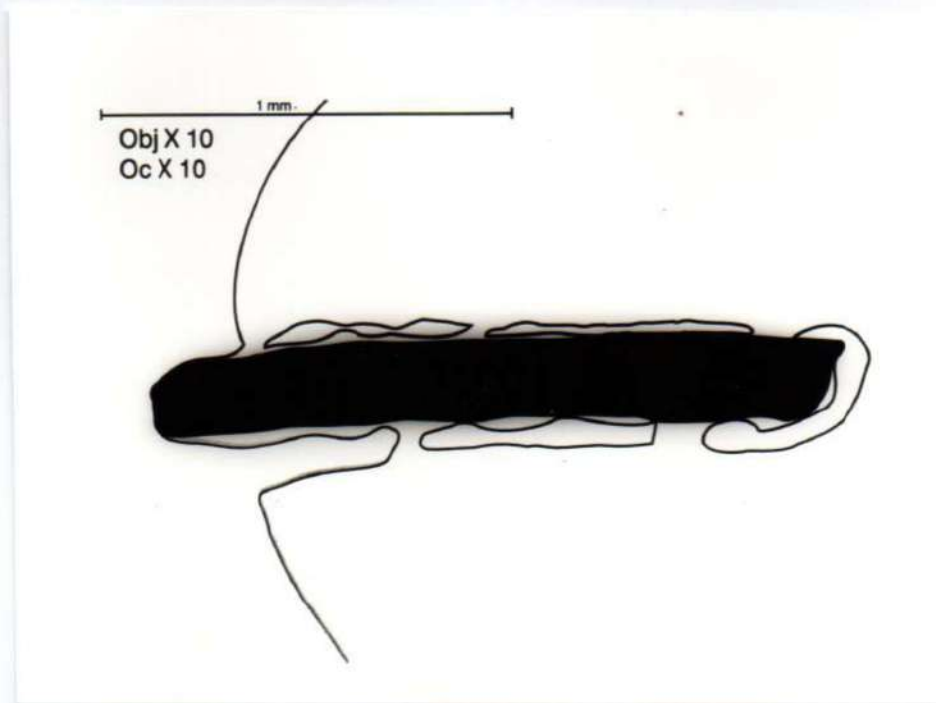


Fig. 5: Proyección del corte histológico a partir del cual se realizó el estudio histomorfométrico.

Se evaluó el porcentaje de oseointegración y el volumen de tejido óseo periimplante. Para la evaluación del porcentaje de oseointegración se determinó el perímetro total del implante y el porcentaje de tejido óseo en contacto con la superficie metálica. Para la determinación del volumen se estimó la cantidad de tejido óseo peri-implante. Las determinaciones histomorfométricas fueron realizadas sobre las proyecciones utilizando un analizador de imágenes (Kontron MOP/AM 03; Carl Zeiss, Germany). Los resultados fueron analizados estadísticamente por medio del test T-Student ($P < 0.05$).

Estudio de la respuesta local ante el efecto de la corrosión de implantes dentales humanos fracasados

El Laboratorio de Biomateriales de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires recibe casos de implantes dentales fracasados por diferentes causas, para su estudio histológico. Entre las causas más frecuentes de fracasos se destacan: la movilidad, la ruptura del metal y la exposición temprana.

En este estudio fueron seleccionados 10 casos de implantes dentales fracasados por movilidad con tejido blando en contacto con la superficie (Fig.6) y en los que histológicamente se observaba la presencia de macrófagos.



Fig. 6: Macroscopía de un implante dental fracasado donde se observa tejido blando en contacto con la superficie metálica y fragmentos obtenidos por curetaje de la lodge quirúrgica.

Los casos fueron incluidos en metacrilato de metilo con la técnica convencional y se realizaron cuatro planos de corte equidistantes entre sí y perpendiculares al eje mayor del implante. Se obtuvieron cortes por desgaste de un espesor aproximado de 70μ micrómetros.

Para cuantificar la presencia de macrófagos en relación al volumen de tejido blando en contacto con el implante, se determinó el área y el espesor de tejido con el fin de estimar el volumen.

Con los preparados histológicos (Fig. 7) se realizaron las proyecciones a una magnificación de X50, según la técnica descrita anteriormente.

Sobre las proyecciones se calculó el área total de tejido blando mediante un analizador de imágenes Kontron MOP-AM 03.



Fig. 7: Corte por desgaste de un corte transversal de un implante con tejido blando en la periferia y en la perforación central. Mag. Orig. X50.

Para la determinación del espesor del corte se midió la lámina de acrílico que contiene al implante. Para ello utilizamos tres procedimientos: **a-** realizamos una marca con tinta indeleble en la cara superior del corte (a) y en la inferior (b) y se montó en forma convencional entre portaobjeto y cubreobjetos (Fig. 8).

Estas dos marcas se enfocan sucesivamente con el microscopio y se toman los valores del movimiento micrométrico y por diferencia de enfoque entre los puntos (a-b) se determina el espesor. En nuestro caso las determinaciones fueron realizadas por dos operadores, tres veces por corte histológico. Para evitar el error que puede introducir la profundidad de foco utilizamos un objetivo de X40, A.N. 0.65; **b-** en los mismos cortes se efectuaron secciones del acrílico, las cuales fueron montadas de canto en un portaobjeto y observadas con un ocular micrométrico; **c-** el otro método para medir el espesor fue la determinación con un equipo Monimeter 2.094 (Institut Dr. Förster), que funciona por la medida de la capacidad del dieléctrico.

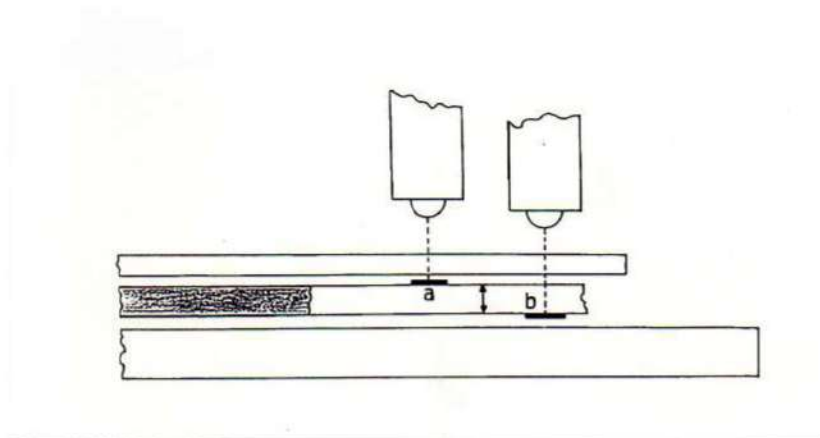


Fig. 8 : Metodología para la determinación del espesor del corte histológico.

Una vez determinado el área y el espesor del corte, se calculó el volumen de tejido blando y se cuantificó el número total de macrófagos observados en todos los planos de enfoque.

Con la finalidad de estimar numéricamente la presencia de macrófagos en los tejidos blandos adyacentes a los implantes dentales fracasados, se desarrolló un índice de presencia macrofágica (I.P.M.), relacionando el volumen de tejido blando con el número de macrófagos cuantificados.

Se determinaron dos sectores (I-II) en el tejido blando que ocupaba la perforación central apical del implante: I, sector en contacto con la superficie interna del metal y II, sector inmediato al anterior. Para cada sector, se determinaron 10 campos de 225μ de diámetro, utilizando un ocular de X40 (Fig. 9), evaluándose en los mismos el número de macrófagos cargados con partículas metálicas en función del espesor del corte (volumen) (Fig. 10).

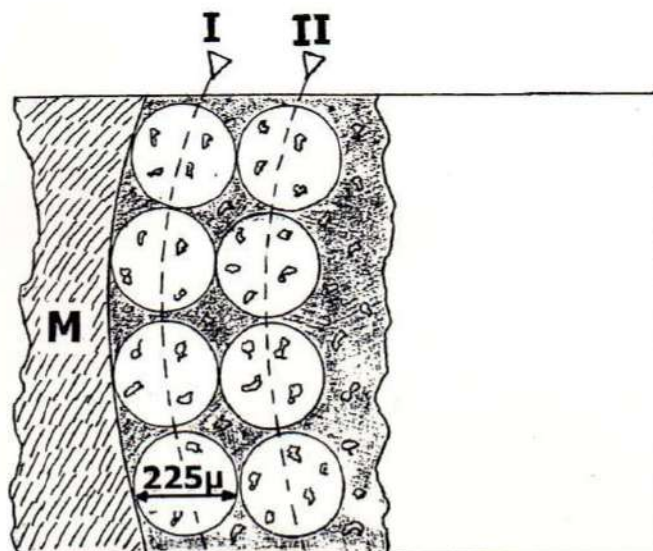


Fig. 9 : Tejido blando en relación al implante. Sectores en función de la distancia al metal (I y II). M: metal

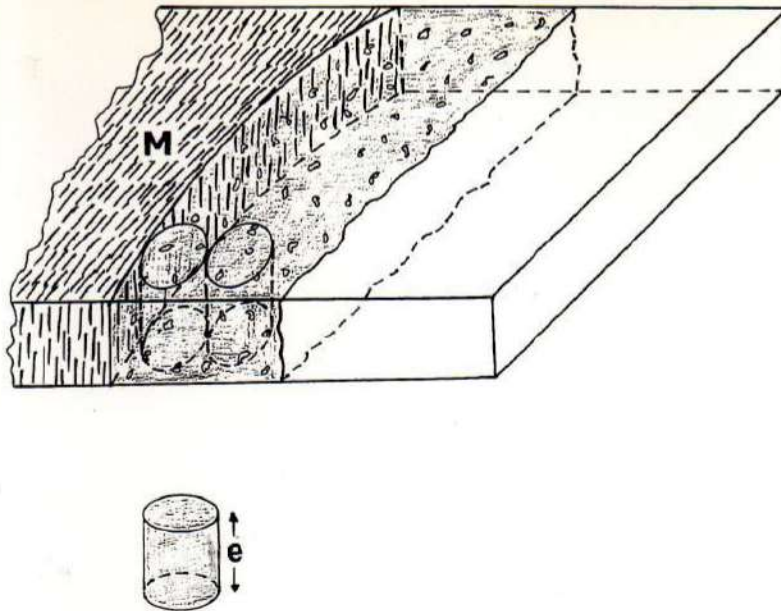


Fig. 10: Volumen de tejido blando en el cual se determina el número de macrófagos (cilindro). M: metal; e: espesor

Obtenidos estos datos se aplicó el Índice de Presencia Macrofágica (I.P.M.). En este estudio evaluamos solamente el I.P.M. en el sector I. El índice relaciona el número de macrófagos con el volumen de los 10 cilindros de tejido blando.

$$\text{I.P.M.} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de macrófagos}}{(\text{Volumen de 10 cilindros de tejido blando}) \times 10^{-6}}$$

Para definir la composición de las partículas que contienen los macrófagos, se disecó el acrílico que contenía al tejido blando con macrófagos, utilizando una lupa estereoscópica. Así, la muestra se procesó para su evaluación mediante EDAX, utilizando la metodología descrita anteriormente.



Evaluación del efecto a distancia de los subproductos de corrosión

El modelo experimental para evaluar la distribución sistémica de los subproductos de corrosión, consiste en el estudio de su probable presencia en células sanguíneas y en órganos "target". En tal sentido, se inyectó óxido de titanio intraperitonealmente.

Animales de experimentación

Se utilizaron 30 ratas Wistar macho de 100g de peso corporal. Se siguieron las directivas del National Institute of Health (NIH) para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NIH Publication No 85-23, Rev. 1985).

Droga administrada

Se administró una inyección intraperitoneal única de una suspensión de dióxido de titanio (TiO_2) (anatasa -Sigma Chemical Company) (experimentales, n=20). Para la inyección se utilizó una aguja 21G (Precision Glide – Brasil) y una jeringa de 5 ml (Coronet – Argentina). El TiO_2 está compuesto por Ti de peso atómico 47 y, oxígeno de peso atómico 16. Sumados estos pesos atómicos se obtiene el peso molecular del compuesto cuyo valor es 79. A través de un cálculo matemático se determina que el 60% del compuesto es titanio puro. En tal sentido, se utilizó una dosis de 16×10^3 mg/kg de peso corporal suspendido en 5ml de solución salina, que contiene 1000 mg de titanio puro. Un grupo paralelo de 10 animales (controles, n:10) fueron inyectados con un volumen equivalente de vehículo (solución salina).

Tiempo experimental

El tiempo de permanencia fue de 6 meses. A los 3 y 6 meses se procedió a la obtención de sangre por punción intracardiaca con aguja 20G (Terumo – USA) y jeringa de 5 ml (Coronet – Argentina) (Fig. 11). El volumen obtenido fue de 2

cm³ . Con el mismo se realizaron extendidos directos, los que fueron coloreados con la técnica de safranina (para facilitar la visualización del posible material fagocitado). A los 6 meses, los animales se sacrificaron por sobredosis de éter y se hicieron autopsias sistemáticas. En las autopsias se tomaron muestras de peritoneo, hígado, riñón, pulmón y bazo.



Fig. 11: Punción intracardíaca para la extracción de sangre.

Procesamiento histológico

Los órganos fueron fijados con formol neutro al 10%, incluidos en parafina y los cortes se estudiaron con hematoxilina – eosina, PAS y sin colorear. En todos los casos para descartar la posibilidad de pigmentos de formol se trataron los cortes con solución saturada de ácido pícrico.

Caracterización cristalográfica

Para demostrar la posible presencia de titanio en los tejidos y su caracterización cristalográfica, se tomaron muestras (hígado, pulmón, peritoneo, riñón y bazo) y se realizó la digestión enzimática de los mismos con tripsina. El sedimento remanente, luego de la digestión, fue analizado cristalográficamente por medio de la técnica de Difracción de Rayos X, en el Laboratorio de Síntesis y Caracterización del Grupo de Materia Condensada del Departamento de Física, Comisión Nacional de Energía Atómica.

RESULTADOS

Estudio de la respuesta local por el efecto de la corrosión por picado de implantes de titanio. Modelo Experimental.

Estudio de las láminas con MEB y EDAX

Las láminas con corrosión por picado mostraron la presencia de picaduras de tipo irregular (Fig. 12), que en la mayoría de los casos se nucleaban a lo largo de las imperfecciones de la superficie, por ejemplo en zonas de rayaduras (Fig. 13). En el fondo de las picaduras, también de tipo irregular, se detectó por EDAX la presencia de conglomerados de óxidos de titanio (Fig. 14).

Las láminas controles mostraron la superficie predominantemente lisa con las rugosidades típicas del proceso de laminado (Fig. 12).

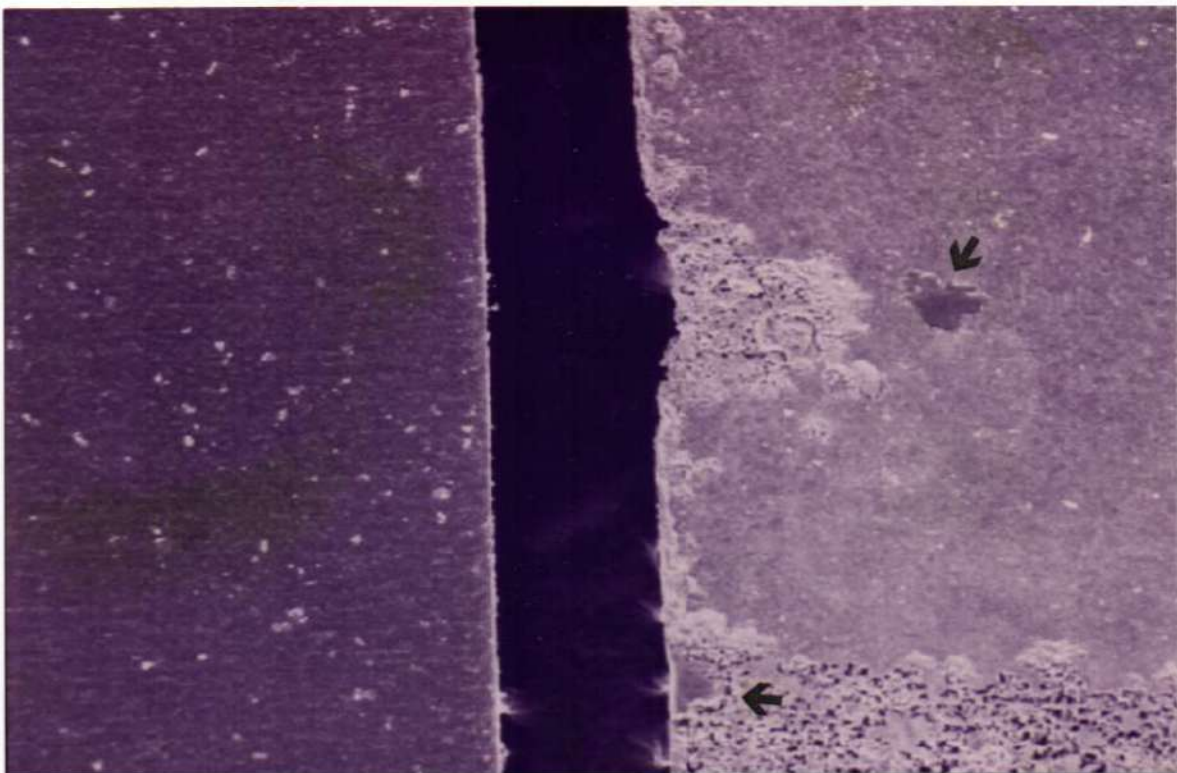


Fig. 12: Microscopía electrónica de barrido en donde se observa la lámina control (izq.) y la experimental (der.) con corrosión por picado. En esta última es clara la presencia de picaduras sobre la superficie de la muestra (→). X40

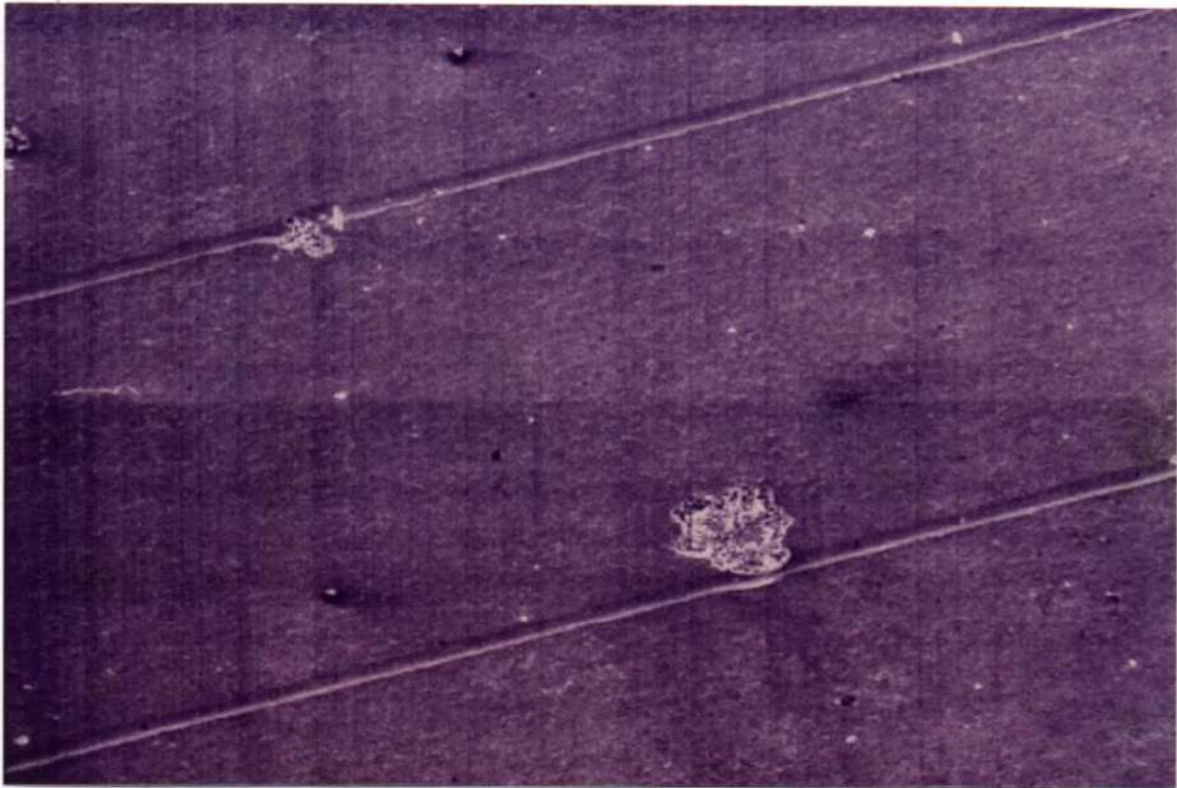


Fig. 13: Experimental (corrosión por picado). Microscopía electrónica de barrido donde se aprecia la presencia de picaduras a lo largo de las imperfecciones de la superficie (rayaduras). X40

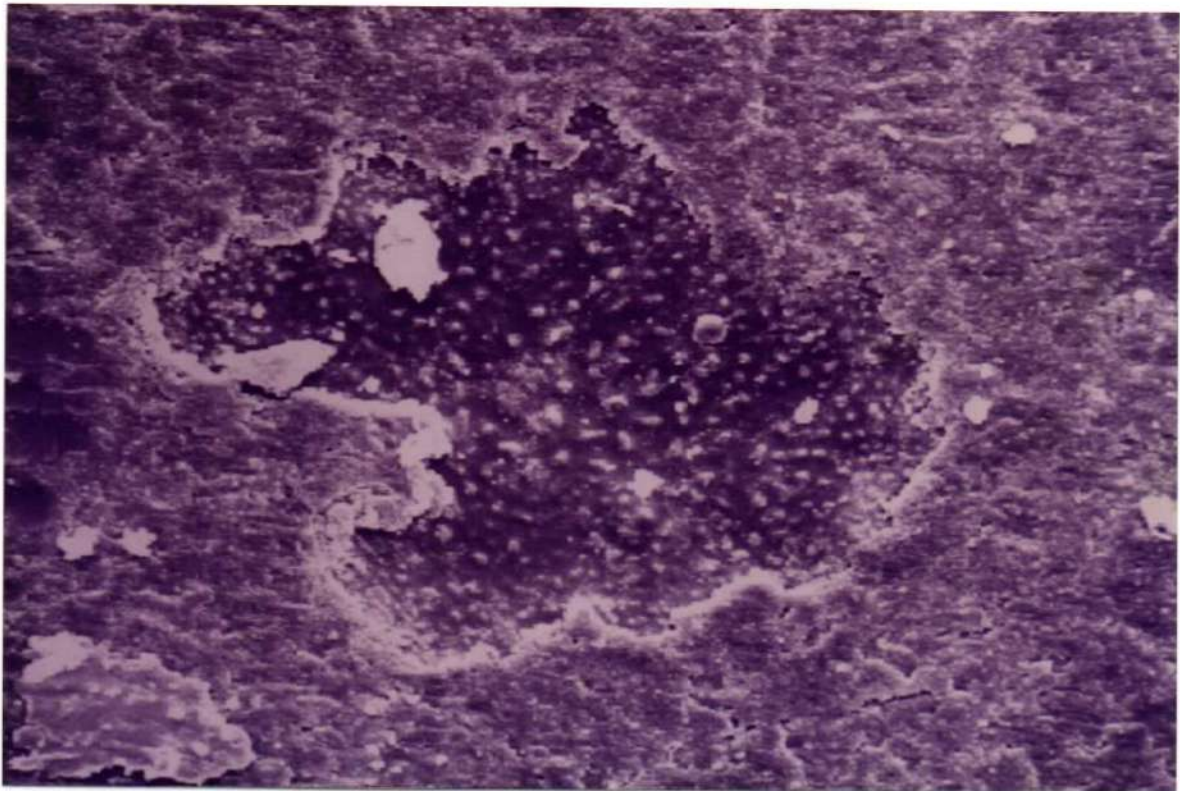


Fig. 14: Experimental (corrosión por picado). Microscopía electrónica de barrido de una picadura en crecimiento. El fondo de la misma es de tipo irregular y se detectó por EDAX la presencia de conglomerados de óxidos de titanio. X400.

Animales de experimentación

En todos los casos, controles y experimentales, el post-operatorio inmediato y mediato no presentó alteraciones.

Estudio Histológico

En los animales del grupo control el estudio histológico reveló extensas zonas de tejido óseo de tipo laminar en íntimo contacto con la superficie metálica (oseointegración) (Figs. 15,16,17,18), asimismo fue posible observar zonas donde el tejido óseo se encontraba separado por tejido blando (médula ósea), y otros sectores donde el tejido medular contactaba con la superficie metálica (integración amigable) (Fig. 19). En ningún caso se evidenció respuesta inflamatoria aguda o crónica peri-implante.

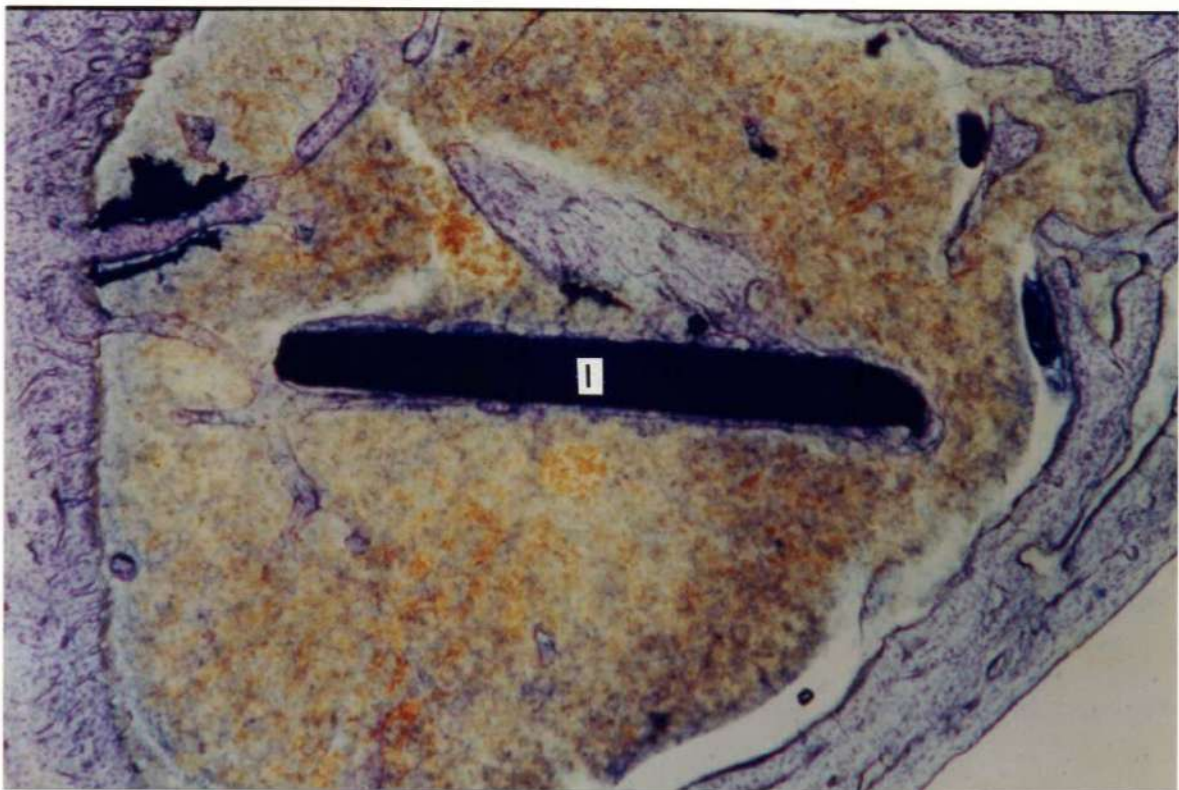


Fig. 15: Control: 14 días post-implante. Corte por desgaste incluido en metacrilato de metilo correspondiente a un corte transversal de la tibia donde se observa cortical, médula e implante (I). Se observa el tejido óseo peri-implante oseointegrado. Mag. Orig. X50. Azul de toluidina 1%.

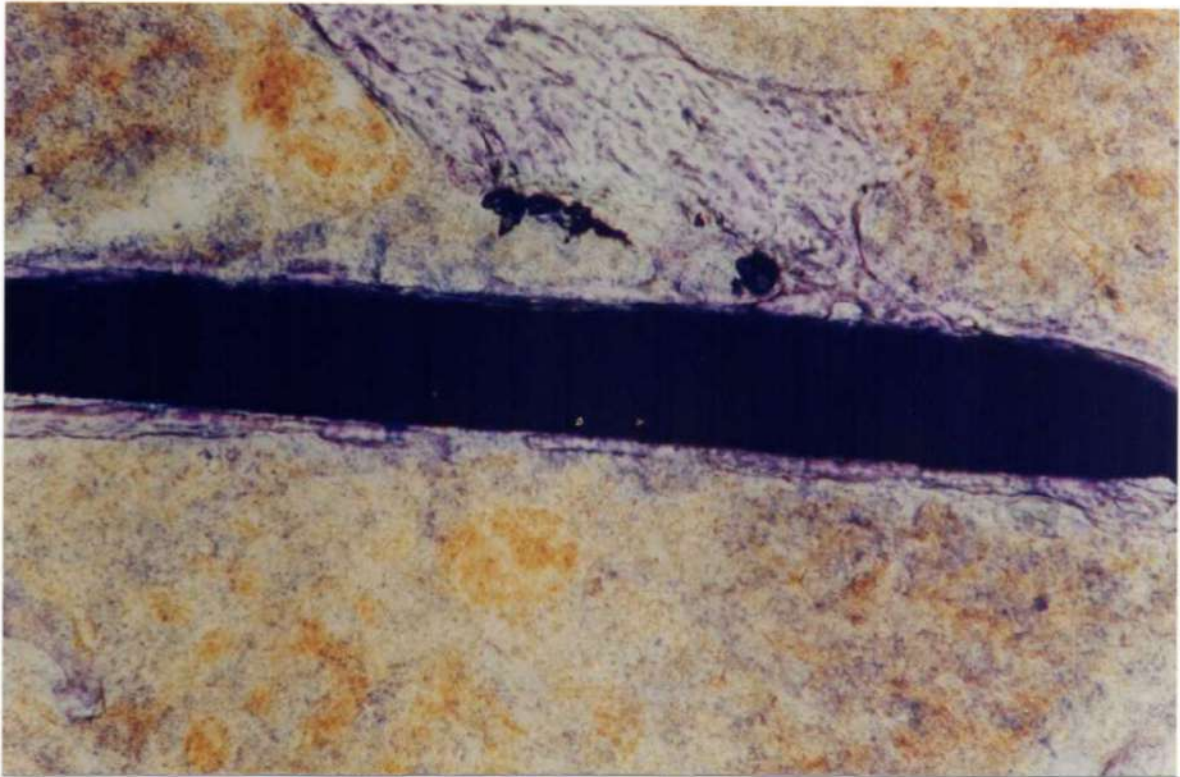


Fig. 16: Control: 14 días post-implante. A mayor magnificación, se aprecia el tejido óseo de tipo laminar con extensas zonas de contacto con la superficie metálica (oseointegración). Mag. Orig. X100. Azul de toluidina 1%.

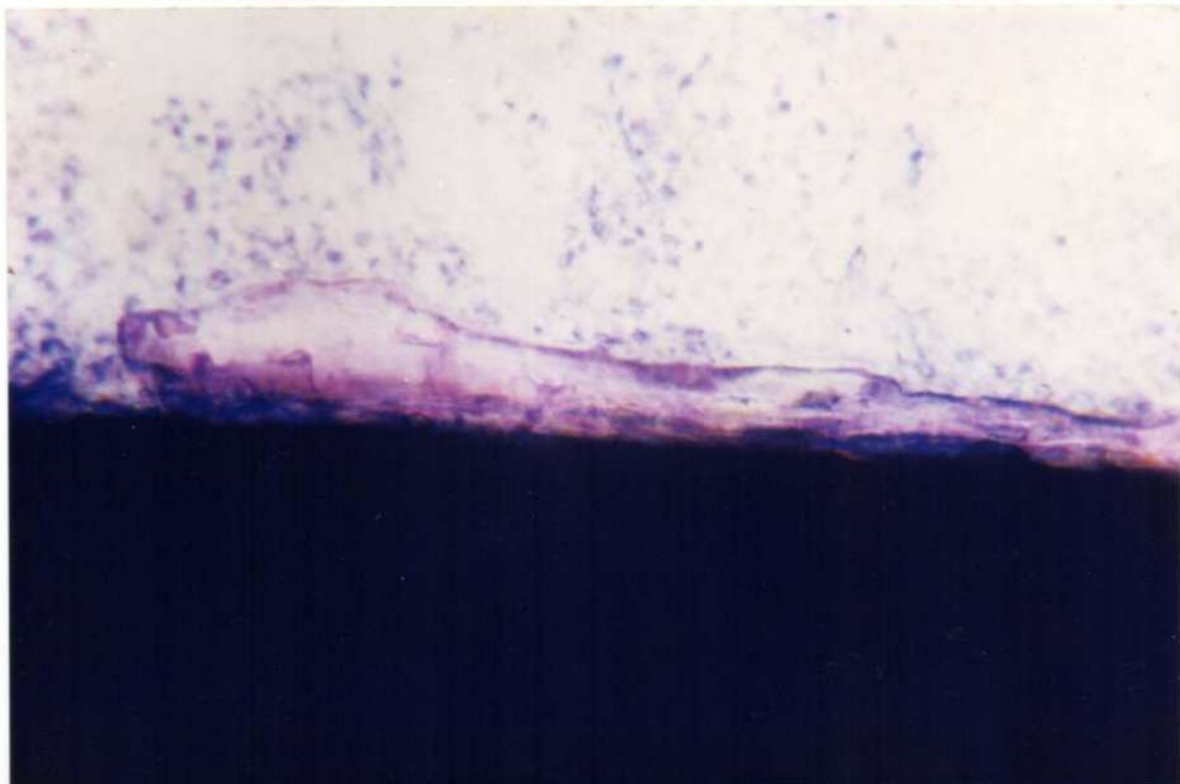


Fig. 17: Control: 14 días post-implante. Corte por desgaste en donde se observa el íntimo contacto de tejido óseo de tipo laminar con la superficie metálica (oseointegración). Mag. Orig. X400. Azul de toluidina 1%.

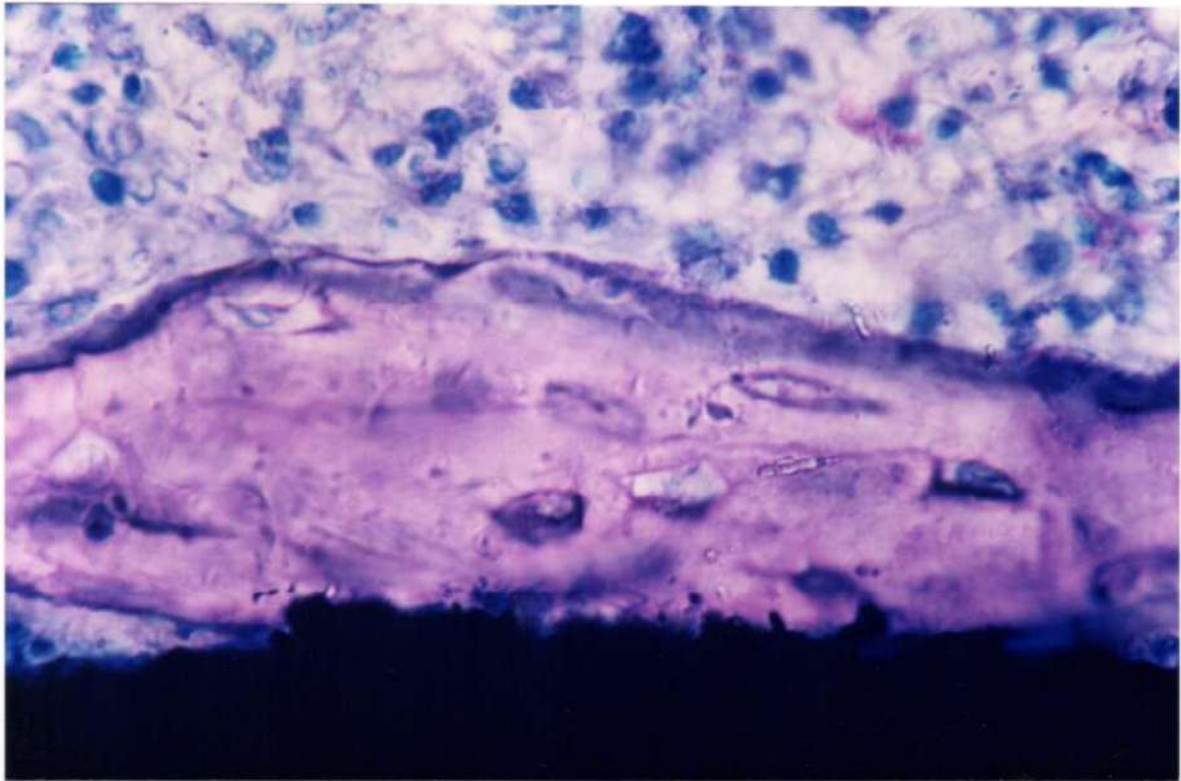


Fig. 18: Control: 14 días post-implante. Sector donde se aprecia claramente la oseointegración. Obsérvese la presencia de lagunas osteocíticas. Mag. Orig. X1000. Azul de toluidina 1%.

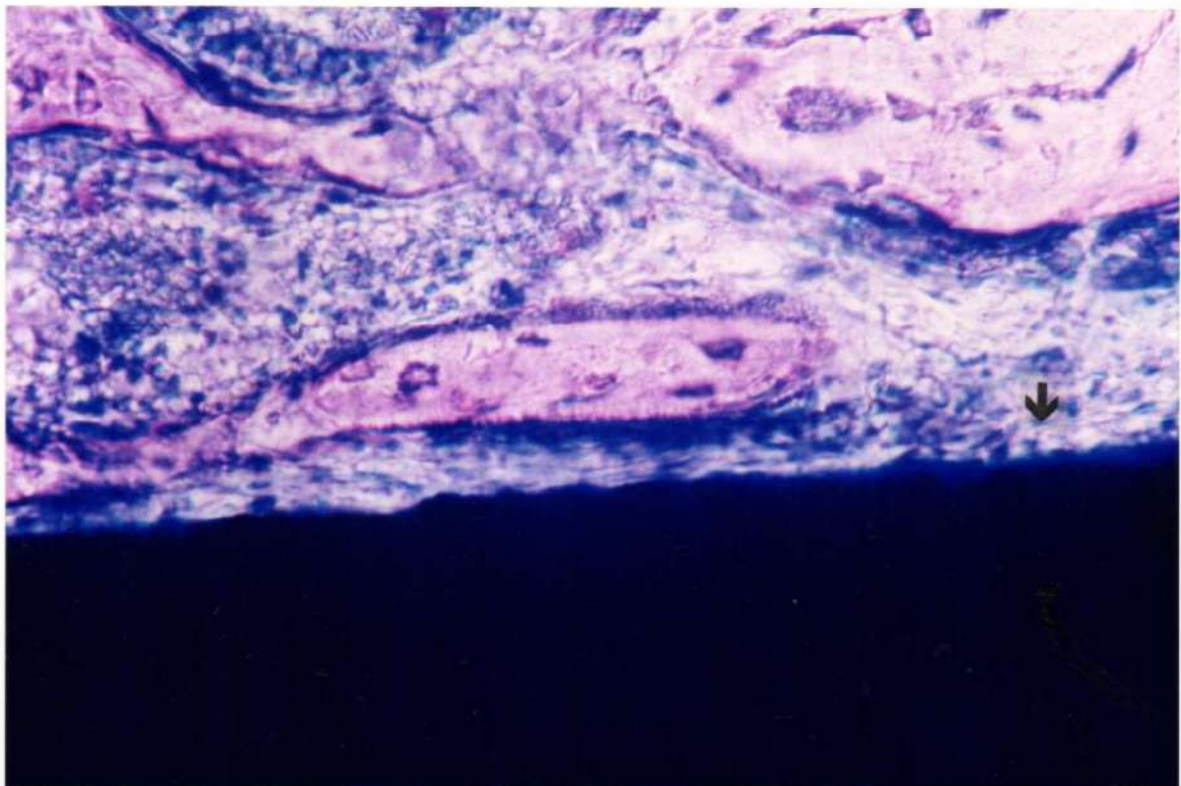


Fig. 19: Control: 14 días post-implante. En algunos sectores se observó el tejido óseo de tipo laminar separado de la superficie metálica por tejido blando. Es evidente la presencia de médula ósea en contacto directo con la superficie metálica (integración amigable (→)). Mag. Orig. X400. Azul de toluidina 1%.

En los casos de las láminas con corrosión por picado el estudio histológico mostró una escasa oseointegración, presente sólo en las zonas donde el metal permaneció pasivado (zonas de no picaduras o alteración de la superficie). (Figs. 20,21). Se observaron extensas zonas de tejido blando en la interfase metal- tejido (Figs. 22,23). La superficie de las láminas metálicas mostraron un patrón muy irregular, con bordes dentados y anfractuados. En algunos casos se encontró la presencia de estructuras cristalinas en la superficie (Fig. 24). En la médula hematopoyética fue posible observar productos de corrosión, libres o fagocitados por macrófagos (Figs. 25,26,27). Es importante destacar que en zonas de vasos sanguíneos los productos de corrosión se disponían rodeando estas estructuras (Figs. 28,29).

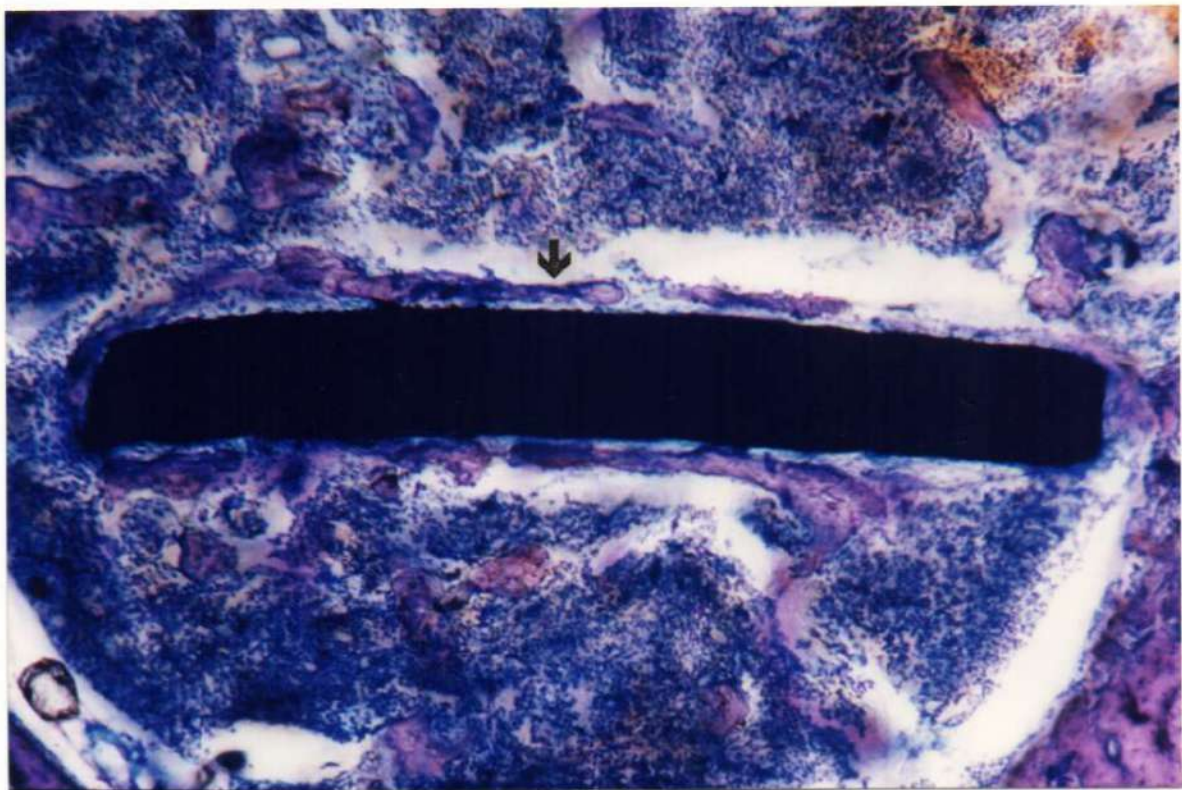


Fig. 20: Experimental : 14 días post-implante. Obsérvese la escasa oseointegración (→). Mag. Orig. X100. Azul de toluidina 1%.

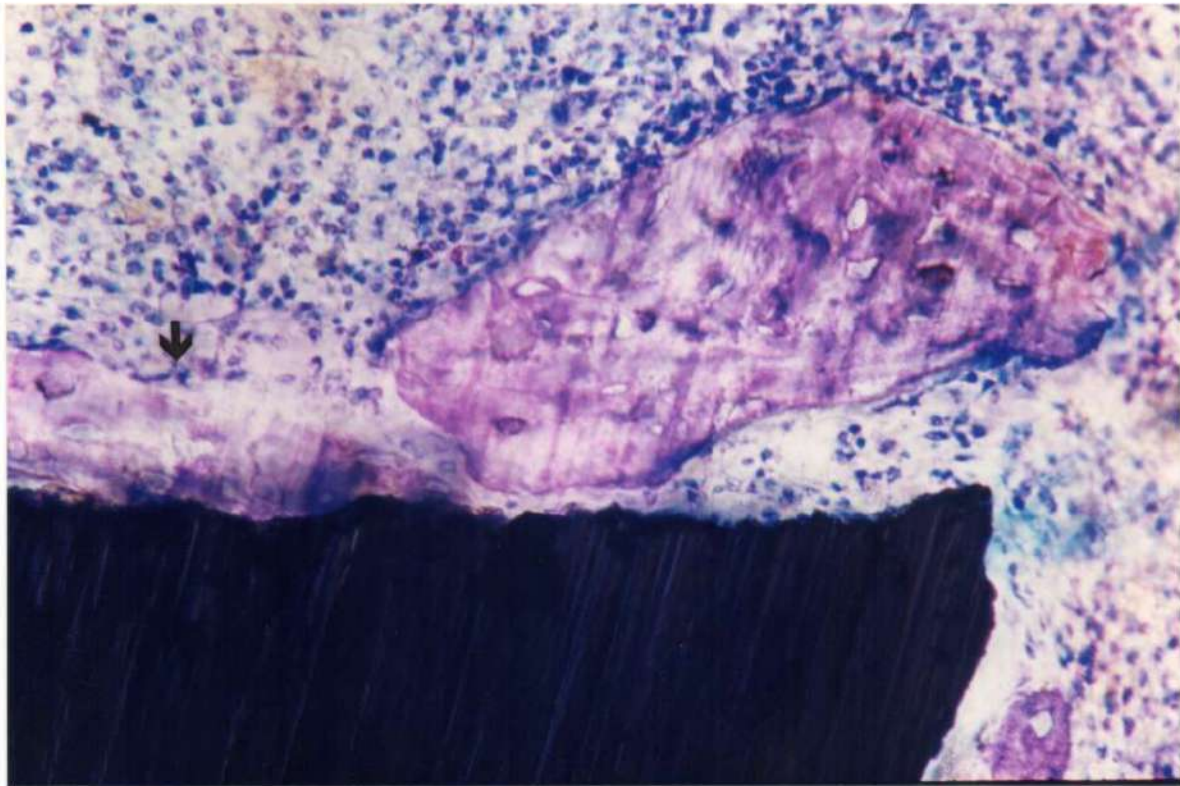


Fig. 21: Experimental: 14 días post-implante. Obsérvese la presencia de oseointegración (→), presente sólo donde el metal permaneció pasivado (zonas sin corrosión por picado o alteración de la superficie). Mag. Orig. X400. Azul de toluidina.

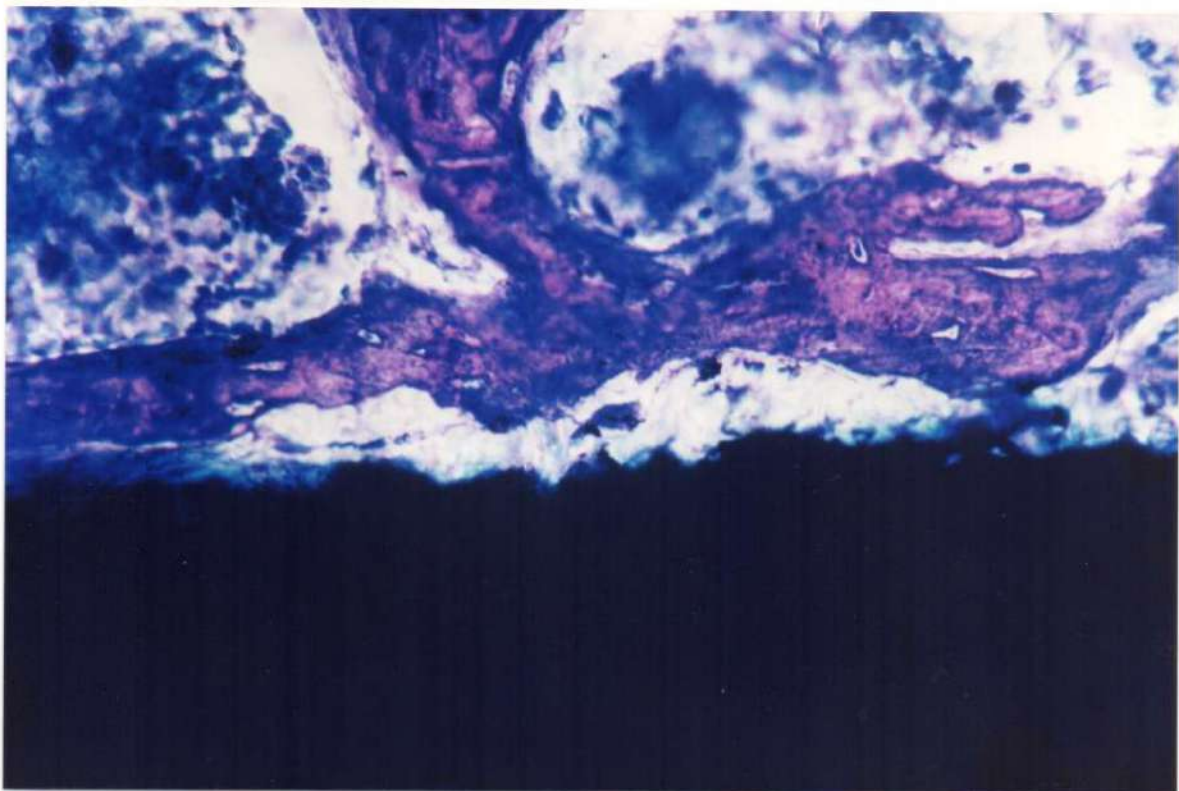


Fig. 22: Mayor magnificación de un sector de la Fig. 20 en donde se aprecia la neta separación del tejido óseo de la superficie metálica del implante. Mag. Orig. X400. Azul de toluidina 1%.

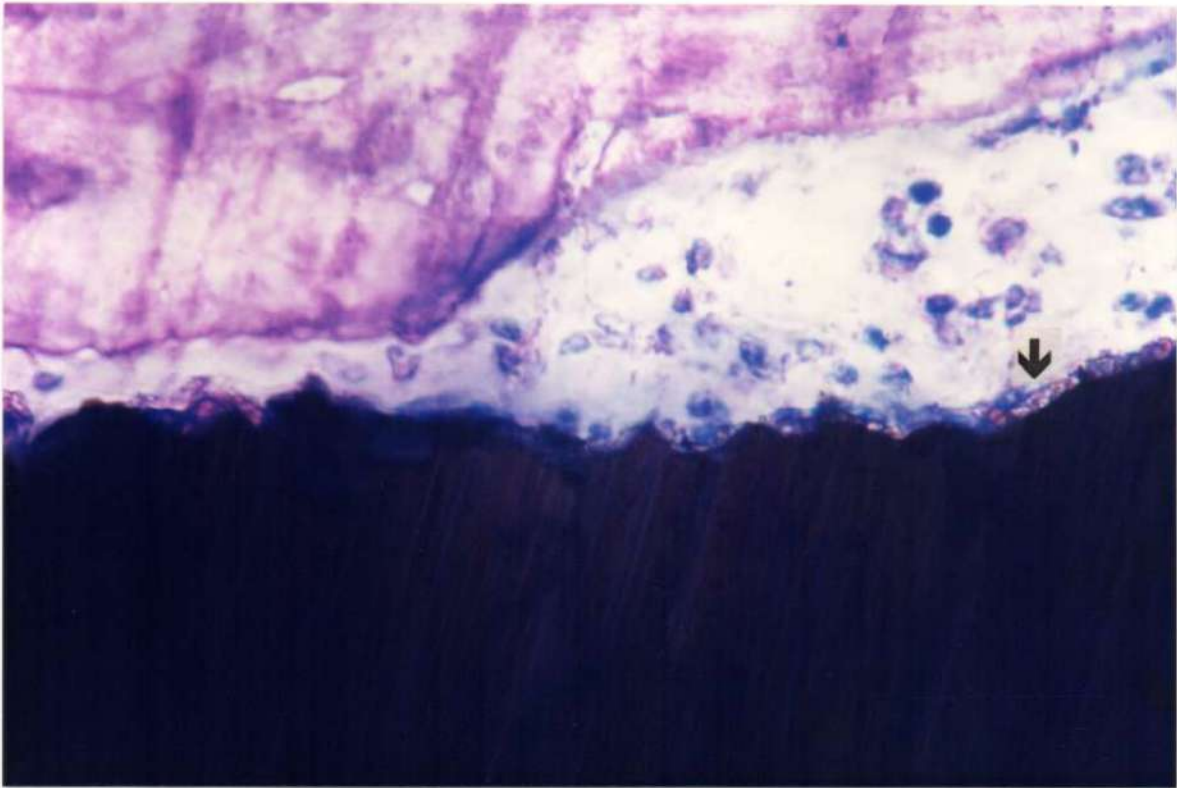


Fig. 23: Experimental: 14 días post-implante. Mayor magnificación de un sector de la Fig. 21, en donde se observa tejido blando en la interfase metal tejido. Se aprecia la irregularidad de la superficie metálica y la presencia de cristales sobre ella (→). Mag. Orig. X1000. Azul de toluidina 1%.

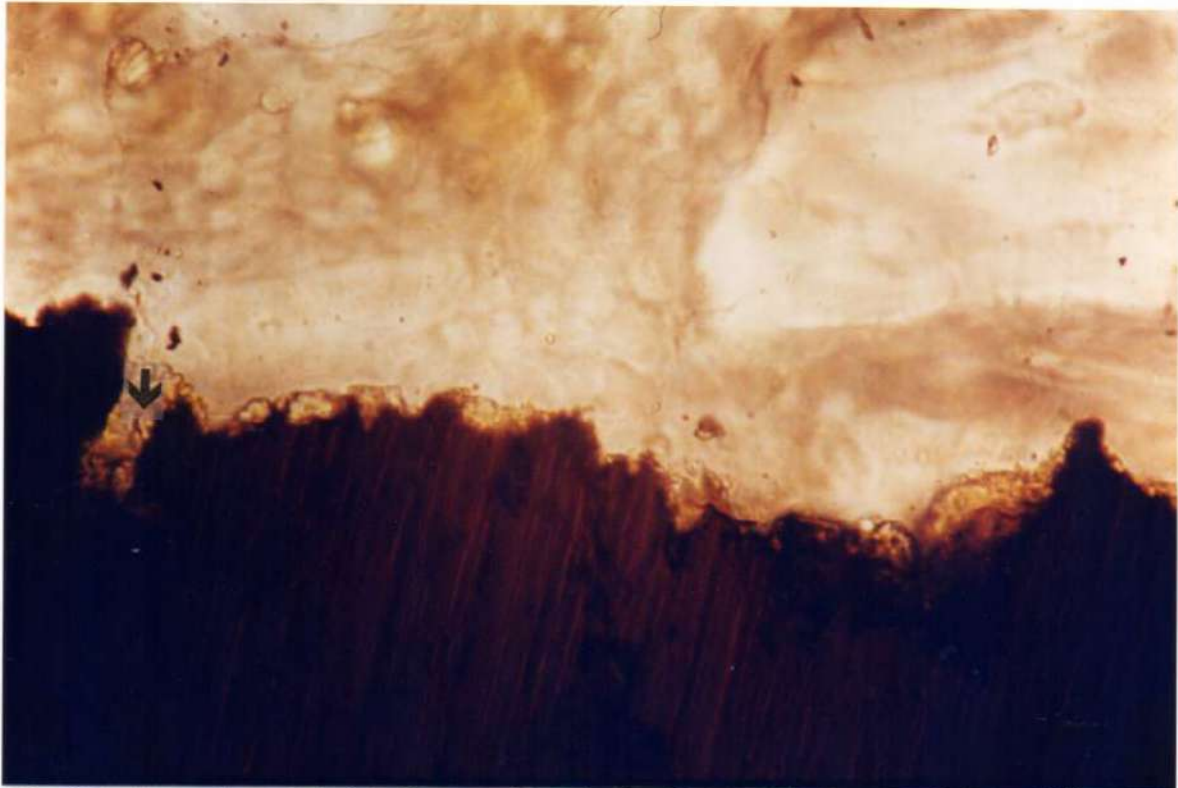


Fig. 24: Experimental: 14 días post-implante. Se aprecia la superficie metálica con un patrón irregular de aspecto dentado y anfractuoso. Es posible observar cristales de cloruro de titanio (EDAX) depositado sobre su superficie y cómo la picadura se introduce dentro de la estructura metálica del implante (→). Mag. Orig. X1000. Sin colorear.

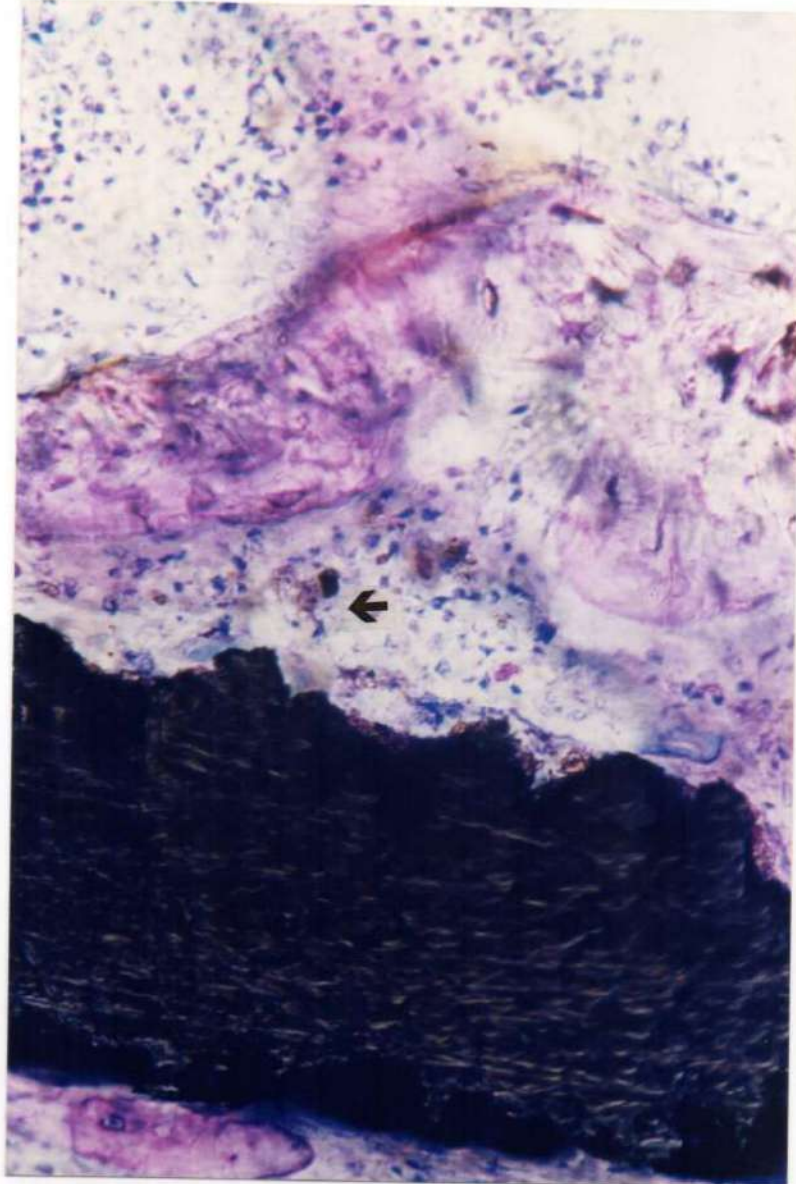


Fig. 25: Experimental: 14 días post-implante. Corte por desgaste. Se observa la presencia de subproductos de corrosión (→) en el tejido blando de la interfase periimplante. Mag. Orig. X400. Azul de toluidina 1%.

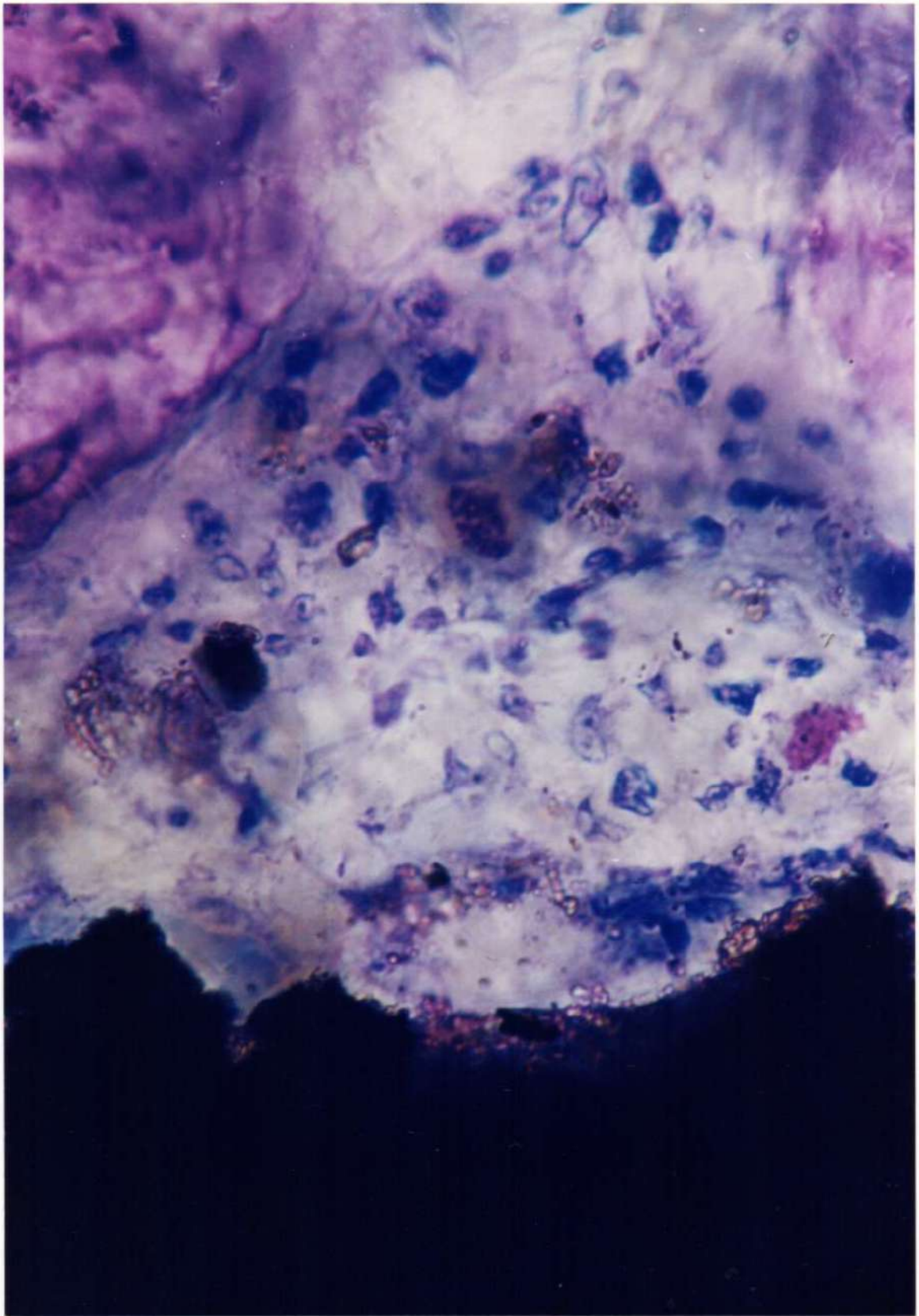


Fig. 26: Experimental: 14 días post-implante. Mayor aumento de la Fig. 25. Se observan estructuras cristalinas dispersas en el tejido blando de la interfase, correspondientes a subproductos de corrosión. X1000. Azul de toluidina 1%.

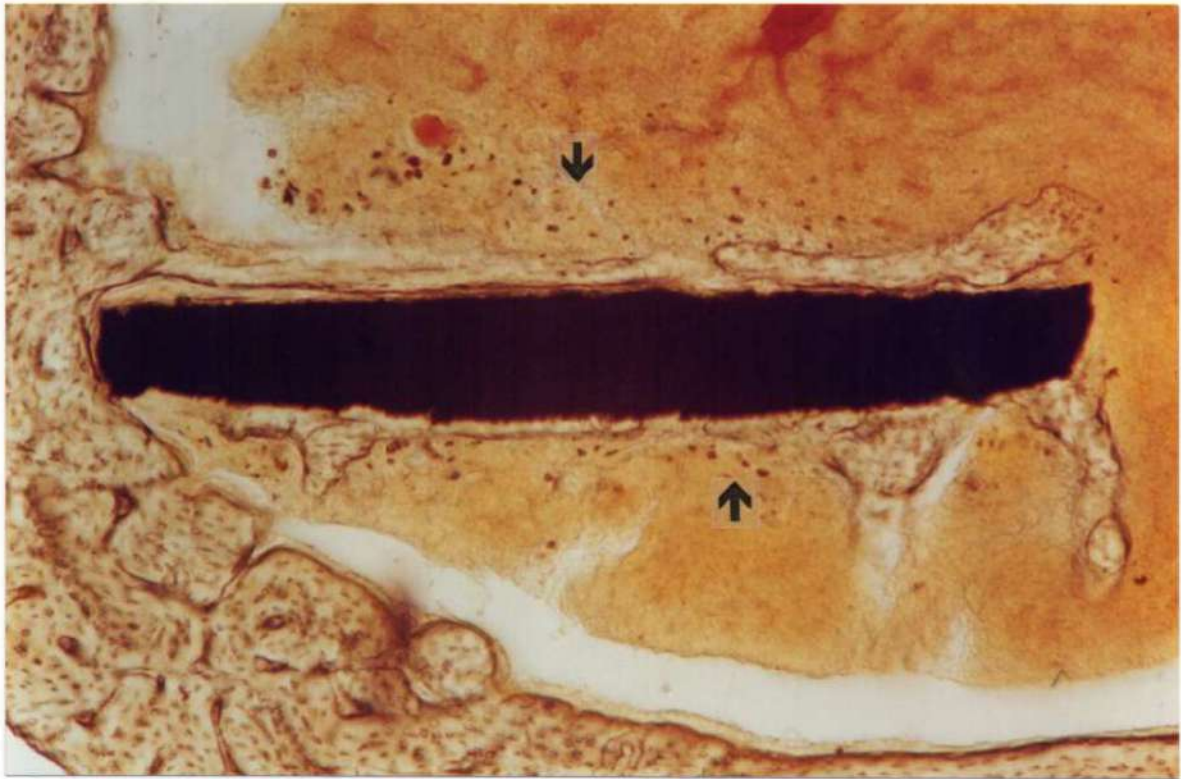


Fig. 27: Experimental: 14 días post-implante. Es evidente la presencia de numerosos subproductos de corrosión (→) en el entorno peri-implante. Mag. Orig. X50. Sin colorear.

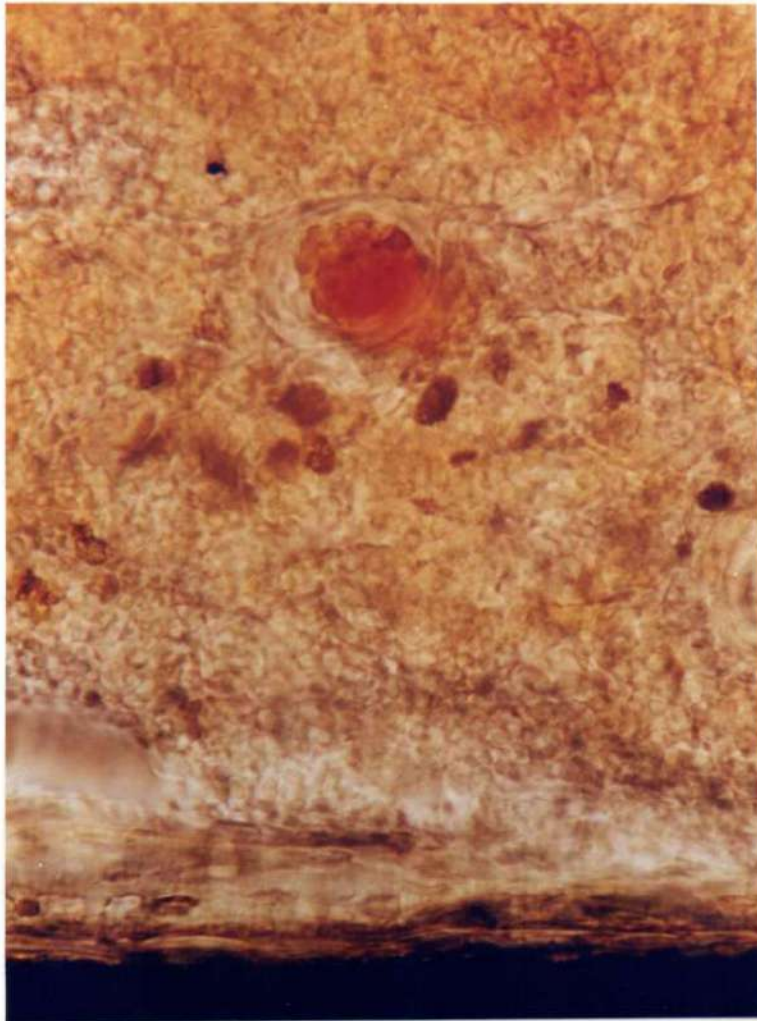
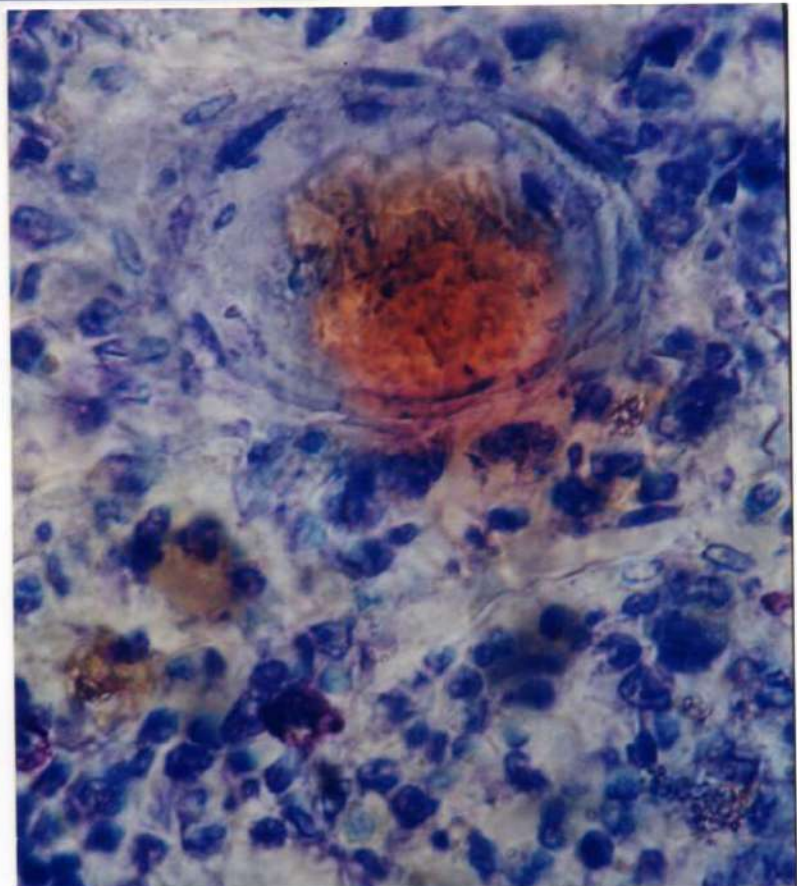


Fig. 28: Experimental: 14 días post-implante. Se observa un vaso sanguíneo en plena médula ósea y la presencia de subproductos de corrosión en dirección al mismo. Mag. Orig. X400. Sin colorear.

Fig. 29: Experimental: 14 días post-implante. Mayor magnificación de la Fig. 28. La presencia de subproductos de corrosión es más evidente. Mag. orig. X1000. Azul de toluidina 1%.



Estudio de los cortes histológicos mediante EDAX

El análisis de los productos de corrosión en el entorno peri-implantario mediante EDAX demostró la presencia de titanio, según muestra el espectro (Figs. 30,31,32).

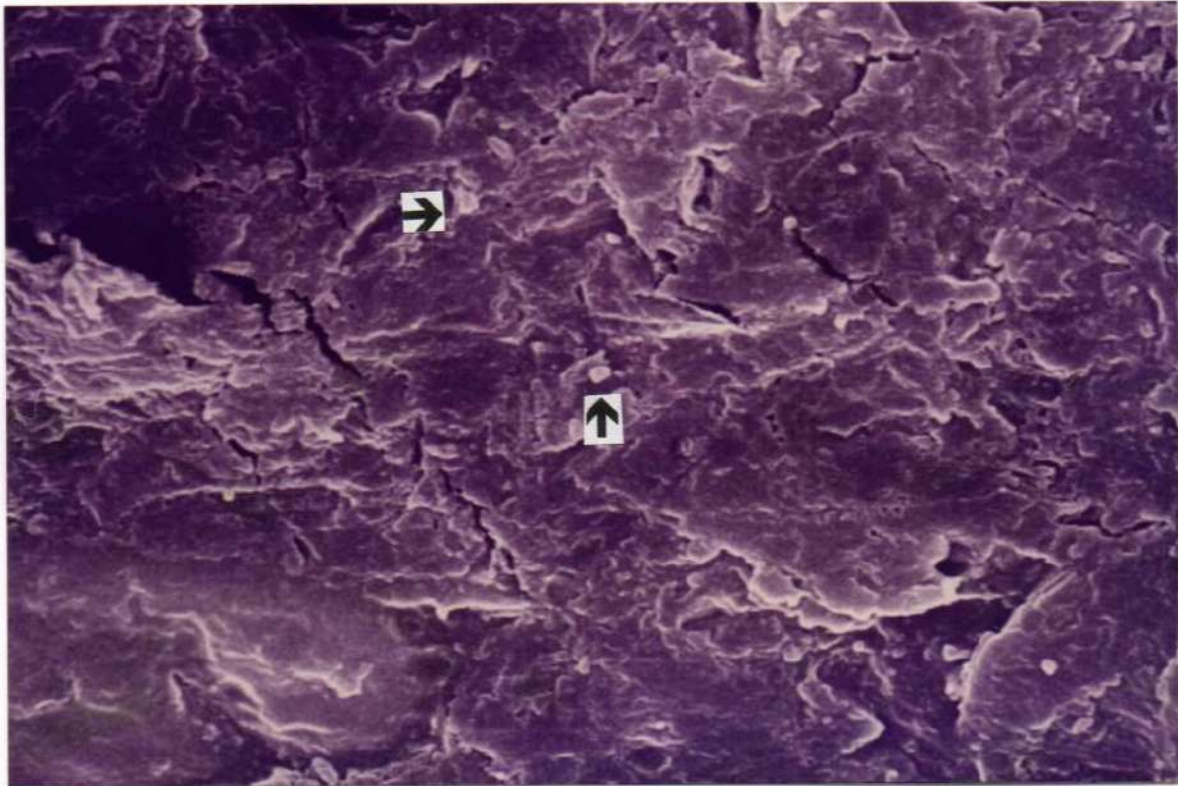


Fig. 30: Experimental (corrosión por picado). Microscopía electrónica de barrido correspondiente a una zona del lecho peri-implantario en donde se aprecia la presencia de subproductos de corrosión (→).

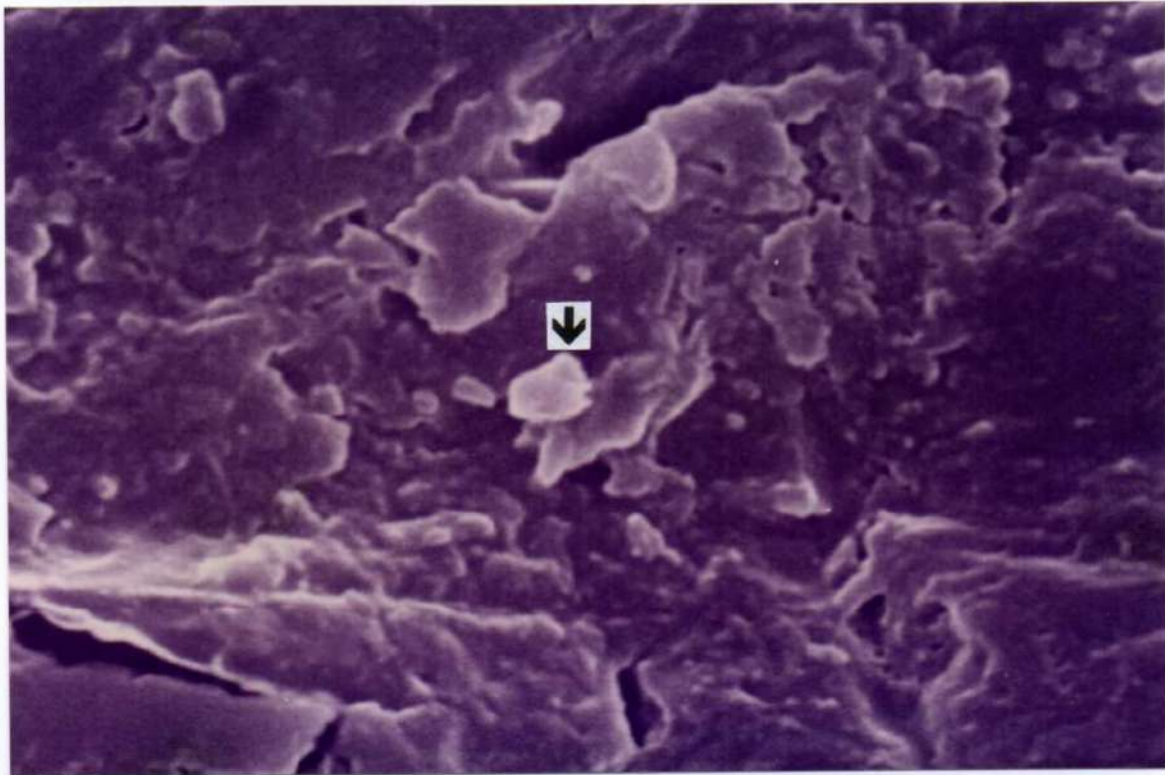


Fig. 31: Experimental (corrosión por picado). A mayor magnificación es posible identificar claramente una de esas partículas (→). Sobre las mismas se realizó el análisis con EDAX.

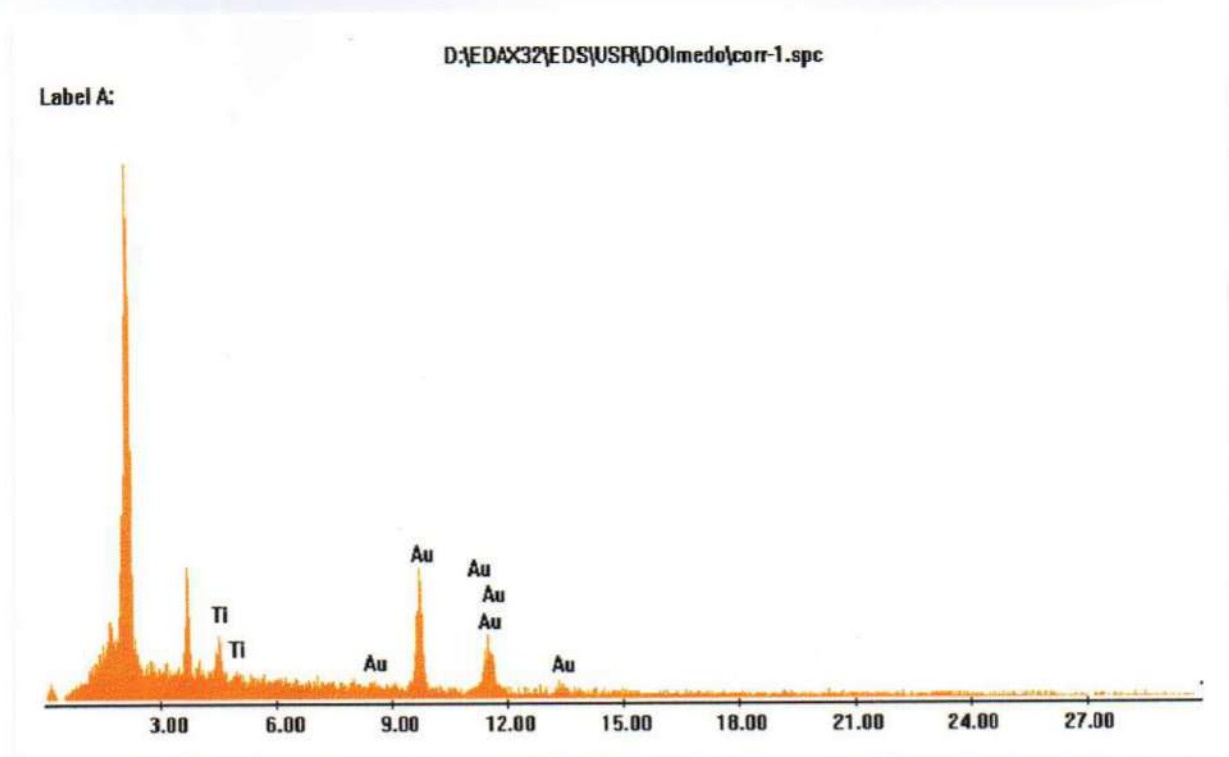


Fig. 32: Espectro resultante del análisis con EDAX donde muestra el elemento titanio en las partículas encontradas en el lecho peri-implantario.

Estudio histomorfométrico

El estudio histomorfométrico del grupo experimental reveló un porcentaje de oseointegración significativamente menor ($6\% \pm 4$) que el grupo control ($26\% \pm 6$, $p < 0.001$). Con respecto al volumen de tejido óseo peri-implante no hubo diferencias estadísticamente significativas entre grupo control y experimental ($10\text{cm}^2 \pm 2$ y $8\text{cm}^2 \pm 3$). (* valores de la proyección magnificación X160).

Parámetros histomorfométricos	Grupo control n:20 \bar{x}	Grupo experimental n:20 \bar{x}	p
% OI	26 ± 6	6 ± 4	< 0.001
Volumen óseo peri-implante	$10\text{cm}^2 \pm 2$	$8\text{cm}^2 \pm 3$	—

OI: oseointegración

* valores de proyección. Magnificación X160.

\bar{x} : promedio

\pm : desviación estandar

Estudio de la respuesta local ante el efecto de la corrosión de implantes dentales humanos fracasados

En todos los casos estudiados se encontró la presencia de macrófagos cargados de partículas (Fig. 33).

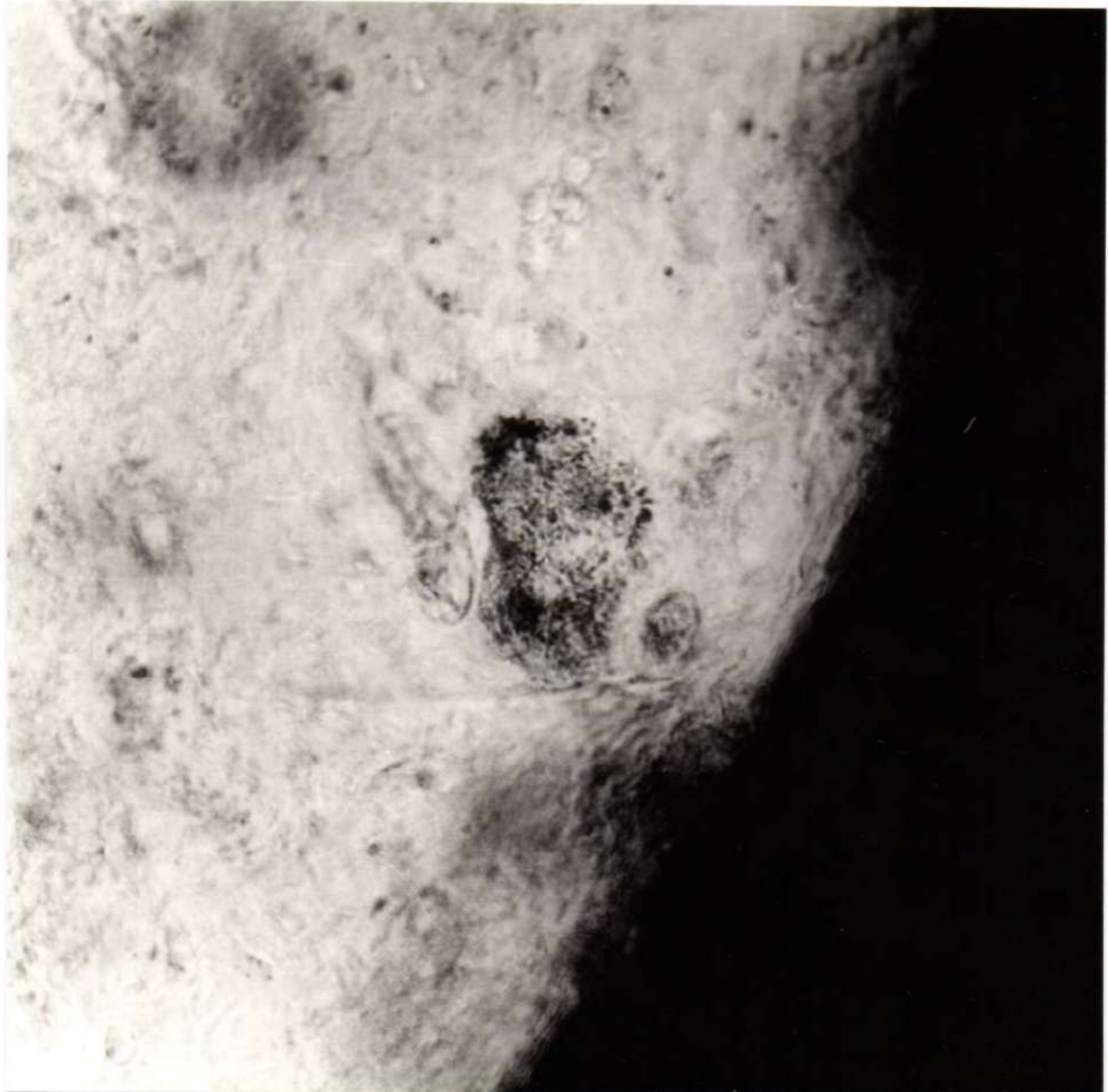


Fig. 33: Corte por desgaste de un implante dental fracasado con tejido blando en contacto. Nótese la presencia de un macrófago cercano a la superficie del implante en donde se observa la presencia de partículas metálicas en su citoplasma. Mag. Orig. X1000.

Las tres metodologías utilizadas para evaluar el espesor de los cortes mostraron coincidencia entre sí. Los valores de espesores oscilaron entre 46 y 82μ (\bar{x} : $67\pm 13\mu$). Se encontró que el volumen de tejido blando oscilaba entre 0.10 y 1.43 mm^3 . (Tabla 1).

En cuanto a la presencia de macrófagos totales el rango estuvo entre 3 y 302. (Tabla 1). La presencia de macrófagos fue más notable en la zona de contacto con el implante metálico (I) respecto a la zona más alejada (II). En todos los casos estudiados se encontró un número variable de macrófagos cuyo índice de presencia macrofágica osciló entre 0.04 y 2.54.

Tabla 1

Caso número n°	Estudio microscopico						Índice macrofágico
	Espesor del Corte (en μ)*	Area de tejido Blando (en mm^2)	Volumen de tejido Blando (en mm^3)**	Macrófagos totales en el corte	Macrófagos en x1	Macrófagos en x2	
1	68	2,40	0,16	30	4	-	0.15
2	67	5,2	0,35	70	16	14	0.61
3	77	1,91	0,14	302	77	60	2.54
4	47	3,33	0,15	107	27	14	1.45
5	46	2,17	0,10	3	1	0	0.05
6	57	4,79	0,27	11	1	1	0.04
7	78	3,81	0,29	18	9	1	0.29
8	66	6,65	0,43	58	13	4	0.50
9	82	2,17	0,17	76	14	13	0.43
10	81	17,76	1,43	76	10	6	0.31

* Medida obtenida por 2 operadores

** Esta medida indica el volumen total de tejido blando presente en el corte, tanto en la hoquedad interna como en la periferia del implante.



El estudio con EDAX permitió detectar la presencia de titanio en los macrófagos (Fig. 34).

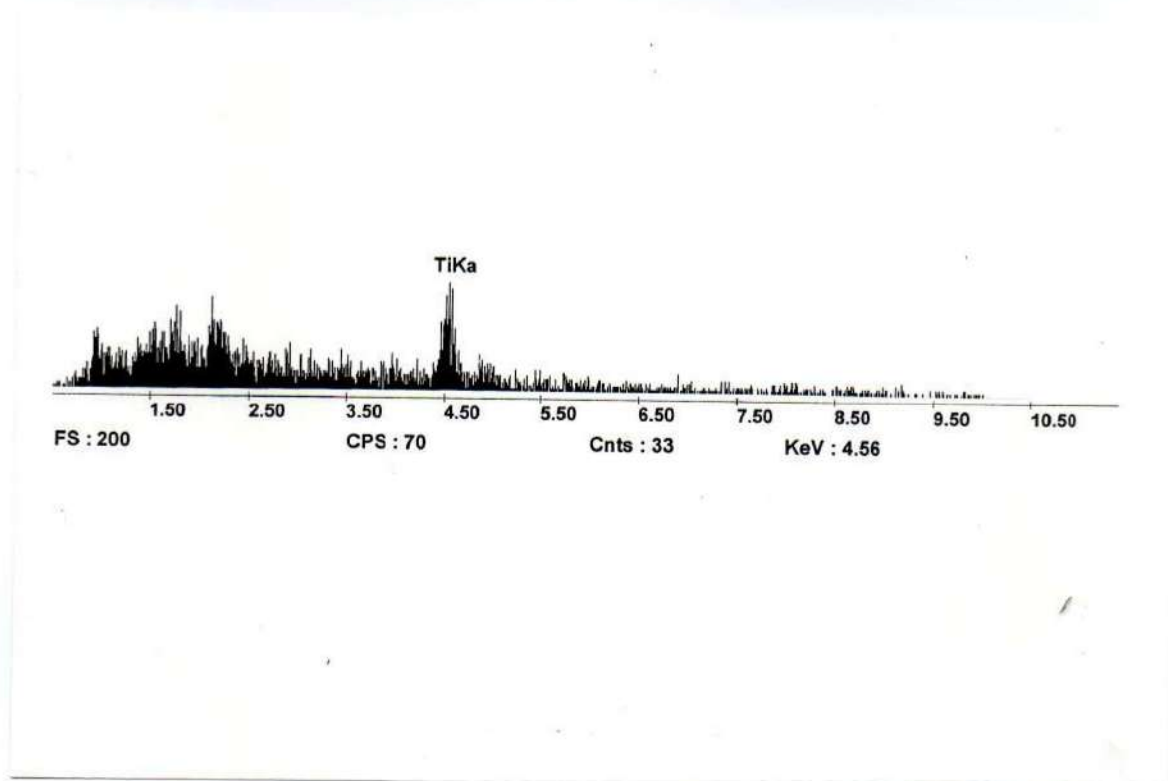


Fig. 34: Se detectó la presencia de titanio en la partículas fagocitadas por los macrófagos peri-implantarios.

Evaluación del efecto a distancia de los subproductos de corrosión

Animales de experimentación

A los 10 días post-inyección 7 animales del grupo experimental evidenciaron una ascitis importante. Ante el signo, se procedió a realizar una punción abdominal con una aguja 21G (Precisión Glide – Brasil) y una jeringa de 5 ml (oronet – Argentina). Se obtuvo una muestra de 3 cm³ color citrina, la que fue centrifugada a 1600 rpm durante 5 minutos. Con el sedimento se realizaron extendidos que fueron coloreados con hematoxilina-eosina.

Estudio macroscópico

En el estudio de las necropsias de los animales inyectados con TiO₂, fue posible detectar en peritoneo algunos depósitos de color blanquecino. En ningún caso se observaron adherencias del peritoneo con el intestino ni tejido de granulación. Tampoco hubo alteraciones macroscópicas en hígado, bazo y pulmón.

Estudios histológicos.

Grupo control: todos los órganos estudiados no evidenciaron alteraciones.

Grupo experimental: en todos los órganos en los que se evidenció la presencia de pigmentos, se descartó la presencia de pigmentos de formol.

Peritoneo. Se encontraron acúmulos de macrófagos cargados de partículas que ocupaban masivamente el citoplasma. Aunque la intensidad del depósito intracelular era muy importante, no hubo formación de células gigantes, ni tampoco indicios de neovascularización importante.

Hígado. Se detectaron macrófagos cargados de partículas. La mayor parte se encontraron en la cercanía de los capilares sinusoides y en los espacios de Kiernan (Figs. 35,36). La superficie hepática no reveló la presencia de macrófagos.

Pulmón. Se encontraron macrófagos alveolares cargados con partículas distribuidos focalmente (Fig. 37).

Bazo. Se observó la presencia de macrófagos distribuidos focalmente, especialmente en los cordones de Billroth (Fig. 38).

Riñón. El tejido mostró un aspecto normal.

En los órganos estudiados, los macrófagos cargados con partículas demostraron ser positivos para la reacción de PAS (Fig. 39).

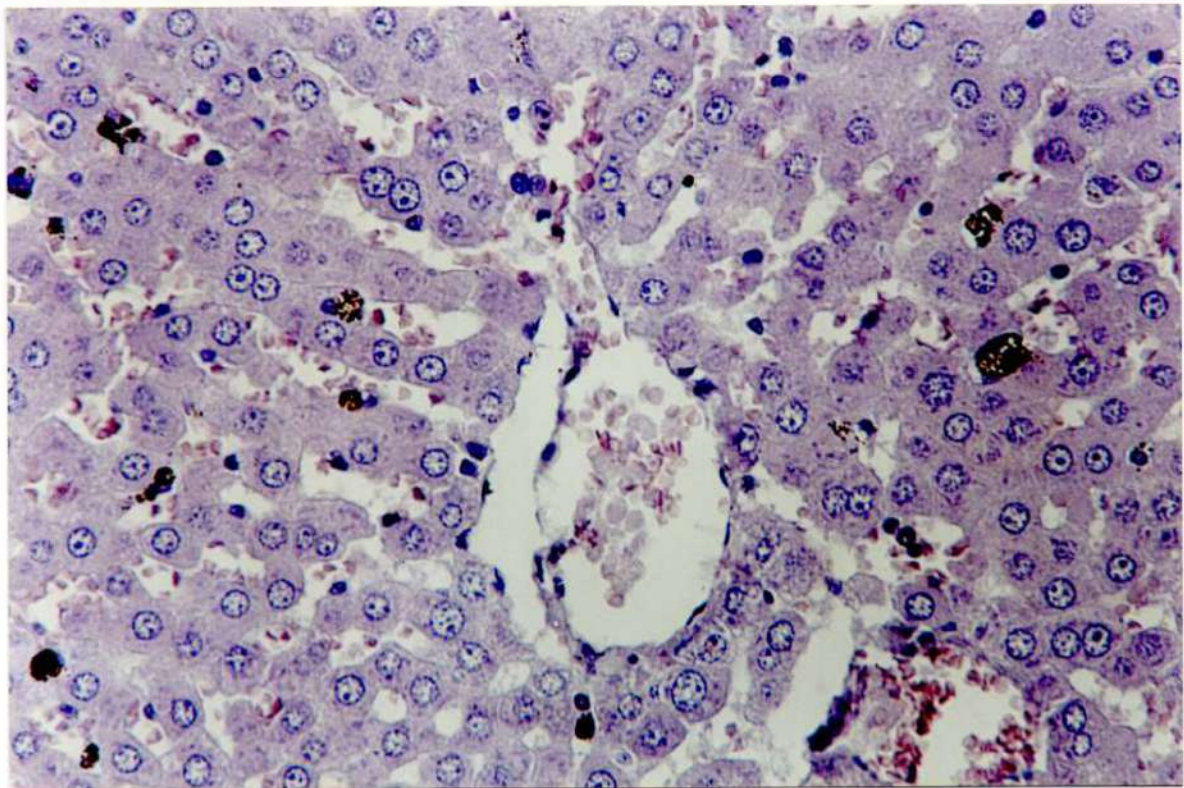


Fig. 35: Hígado. Obsérvese la presencia de macrófagos cargados con partículas de titanio. Mag. Orig. X400. H-E.

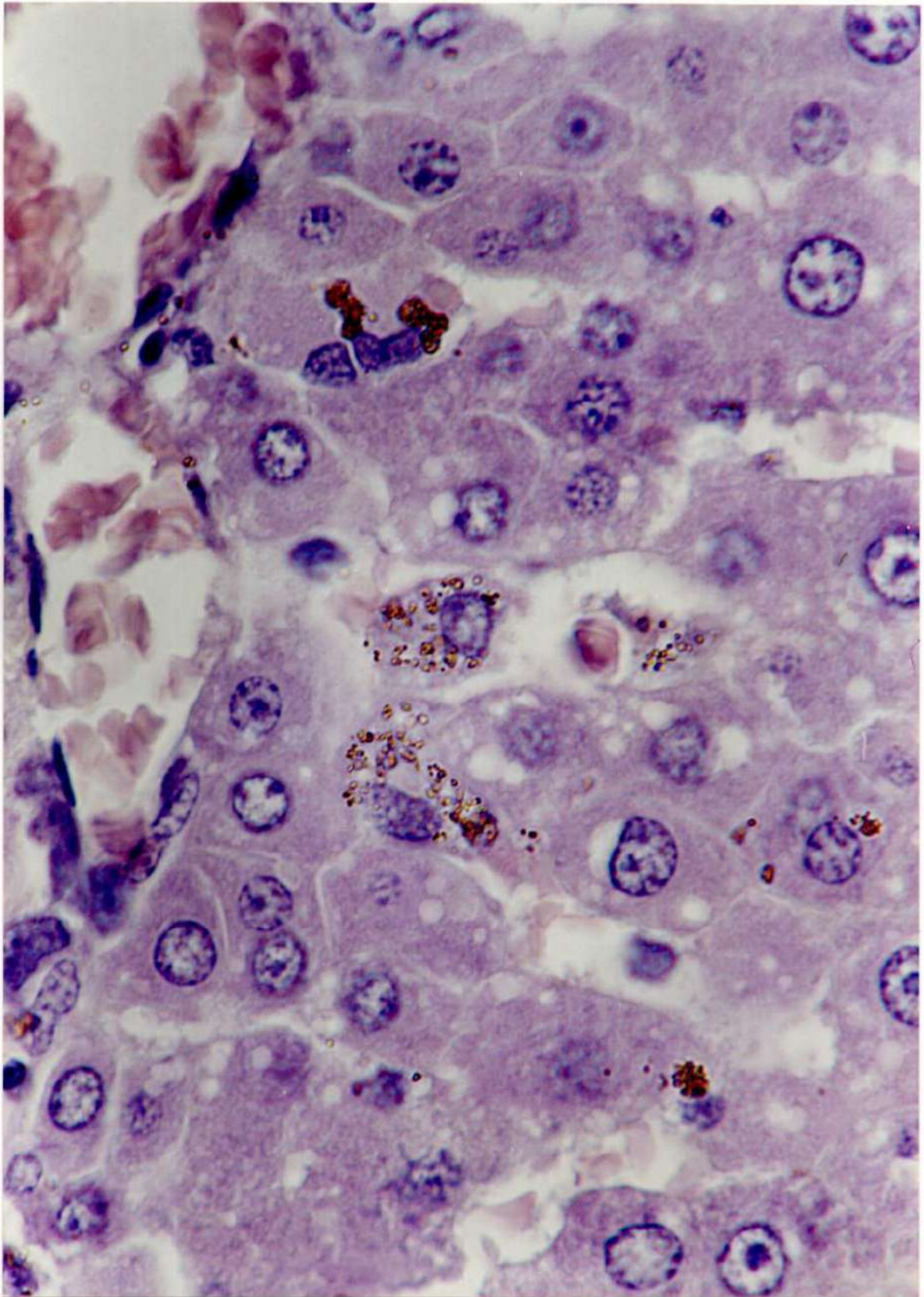


Fig. 36: Hígado. Mayor magnificación de la Fig. 35. Se aprecia claramente el material fagocitado en el citoplasma celular de macrófagos. Mag. Orig. X1000. H-E.

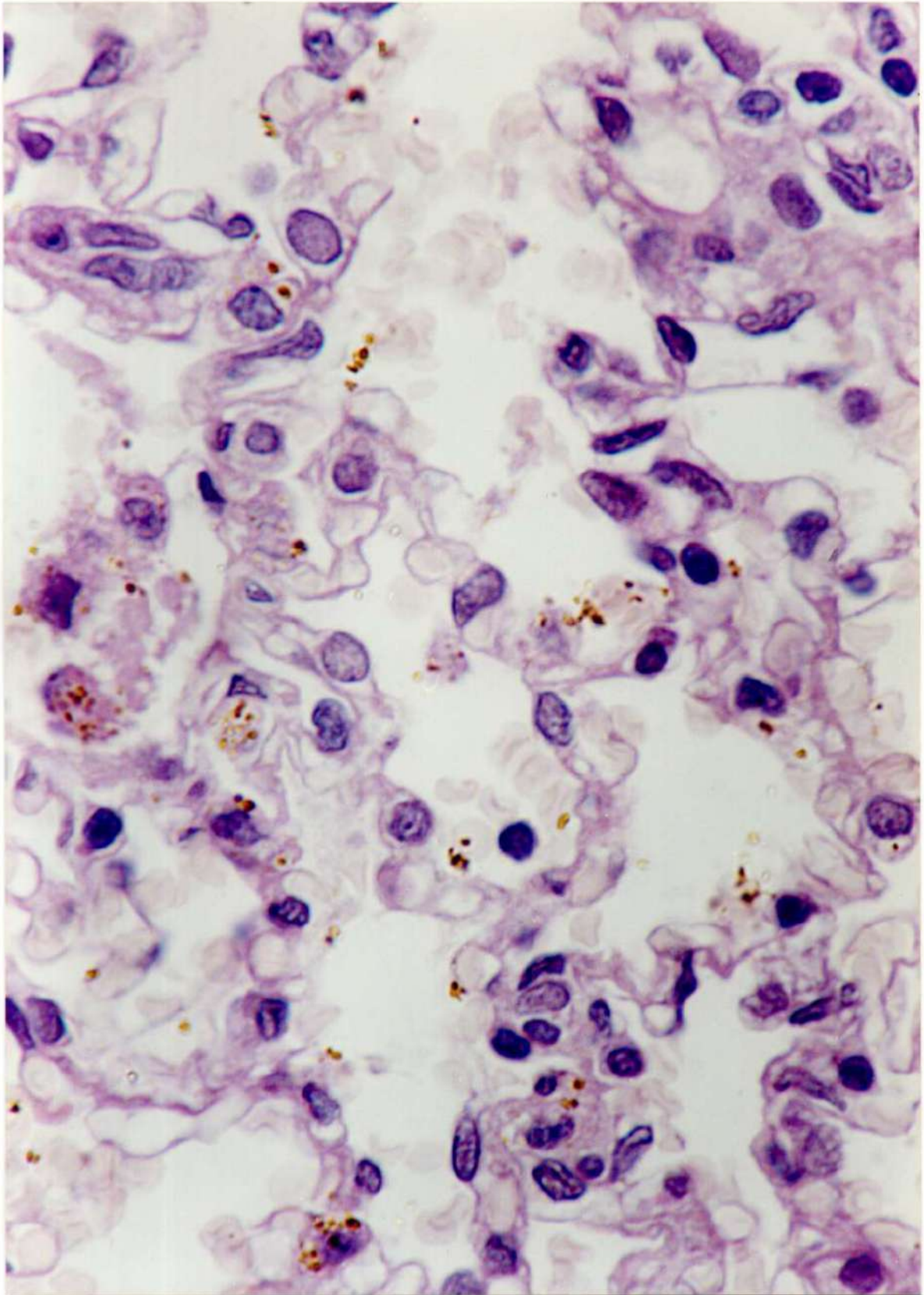


Fig. 37: Pulmón. Es posible observar macrófagos cargados con partículas en el parénquima pulmonar. Mag. Orig. X400. H-E.

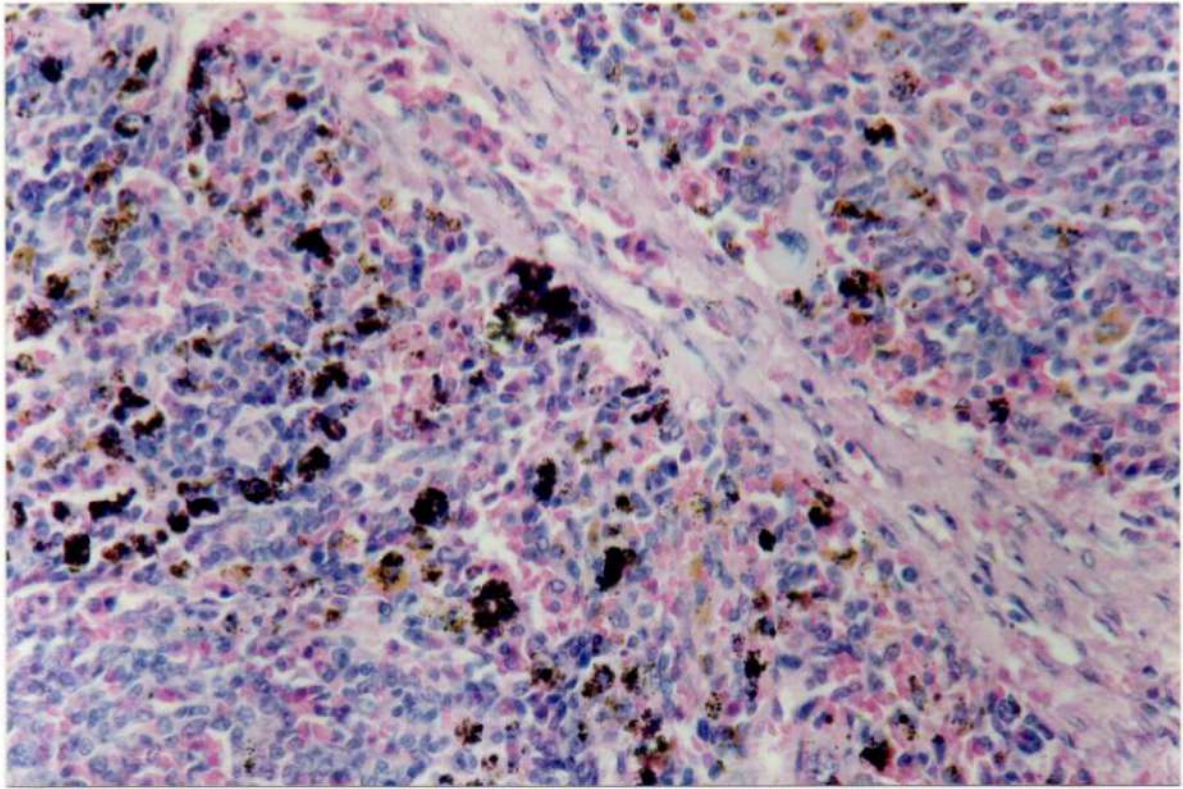


Fig. 38: Bazo. Es evidente la presencia de macrófagos dispersos en el parénquima. Mag. Orig. X400. H-E.

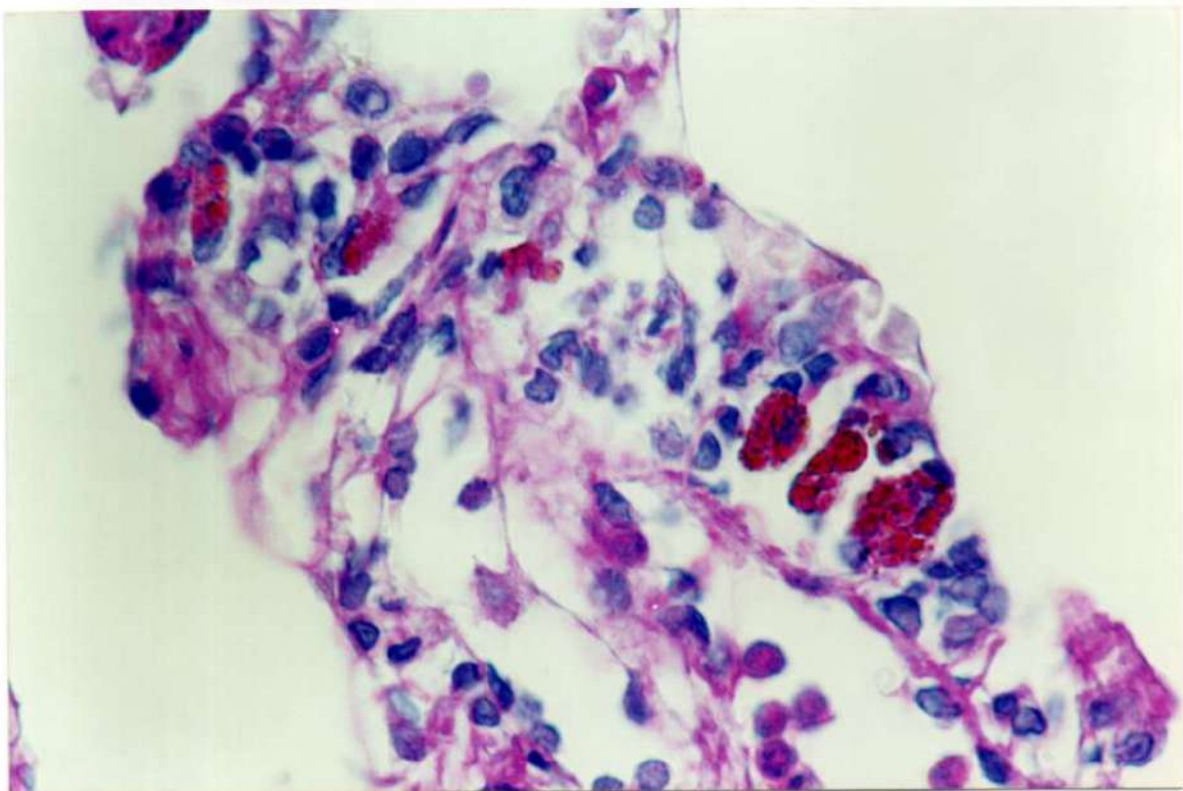


Fig. 39: Pulmón. Mayor magnificación. Nótese la reacción PAS positiva en el citoplasma de los macrófagos cargados con titanio. Mag. Orig. X1000.

Difracción de Rayos X.

El estudio del sedimento obtenido luego de la digestión enzimática de los tejidos, reveló la presencia de TiO_2 (anatasa) (Figs. 40,41).



Fig. 40: Microscopía electrónica de barrido que muestra el sedimento resultante luego de la digestión enzimática con tripsina.

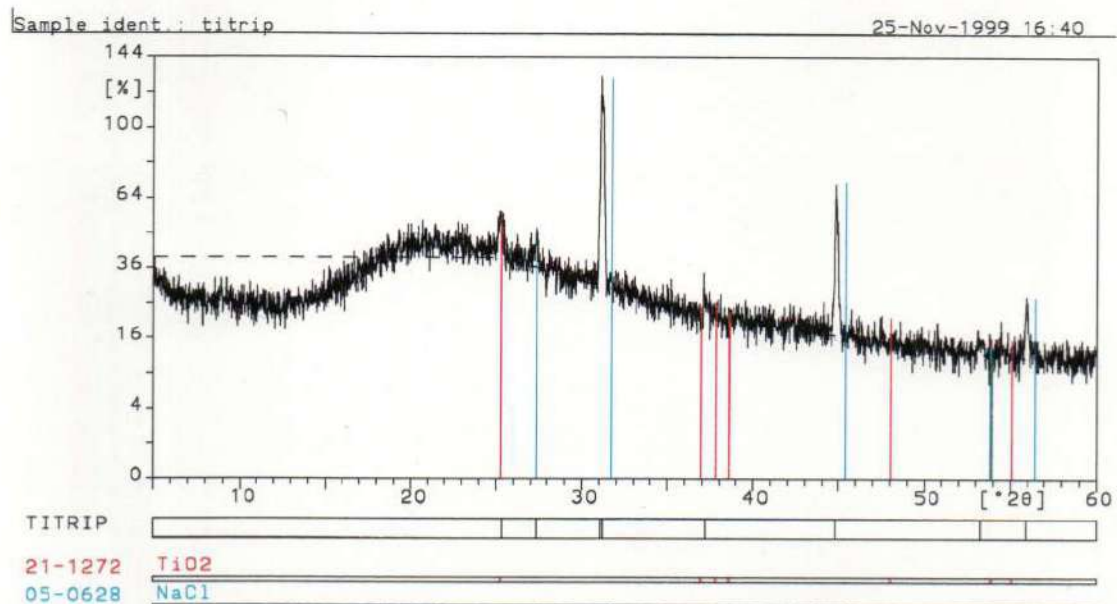


Fig. 41: Se detectó la presencia de anatasa (dióxido de titanio) en el sedimento resultante luego de la digestión enzimática de los tejidos analizados. Difracción de rayos X.

Estudio histológico del líquido abdominal (ascitis n:7)

Los extendidos demostraron la presencia de abundantes macrófagos peritoneales cargados con partículas en su interior (Fig. 42). Asimismo fue posible observar neutrófilos y linfocitos (Fig. 43).

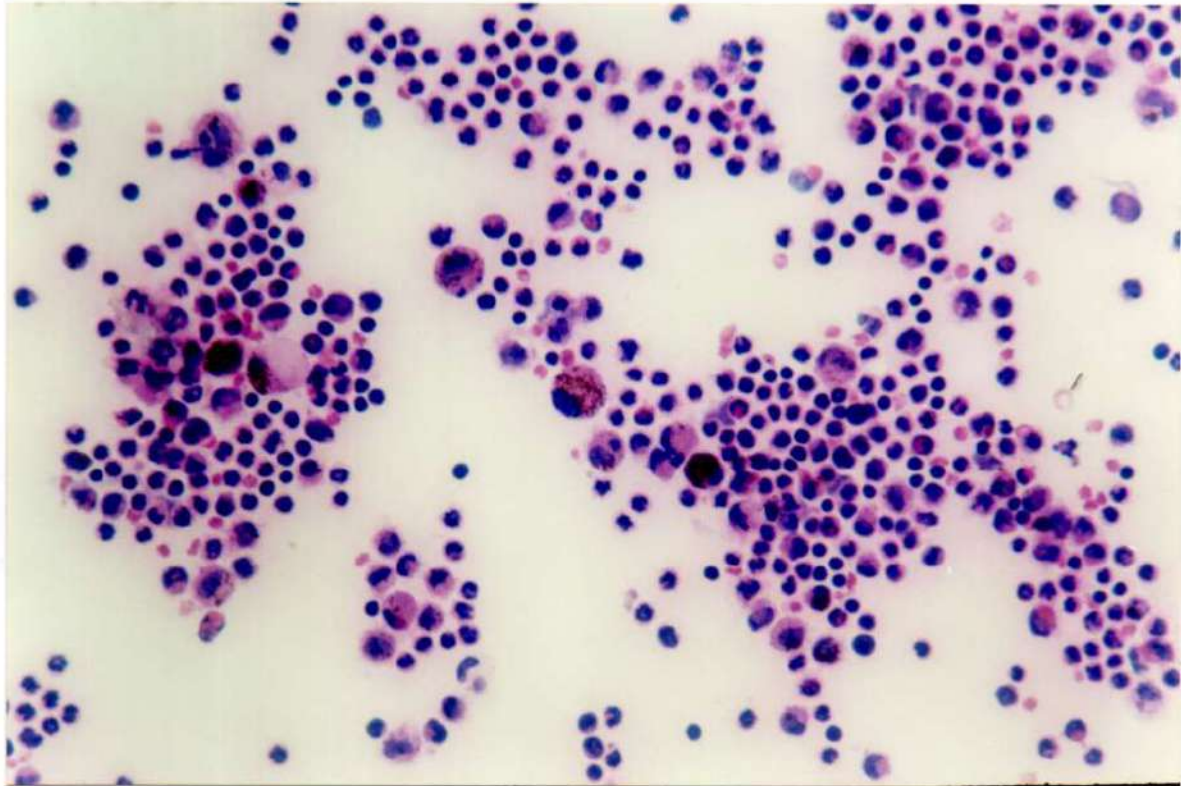


Fig. 42: Extendido del material correspondiente a la punción abdominal (ascitis). Nótese la presencia de macrófagos peritoneales cargados con dióxido de titanio. Mag. Orig. X400. H-E.

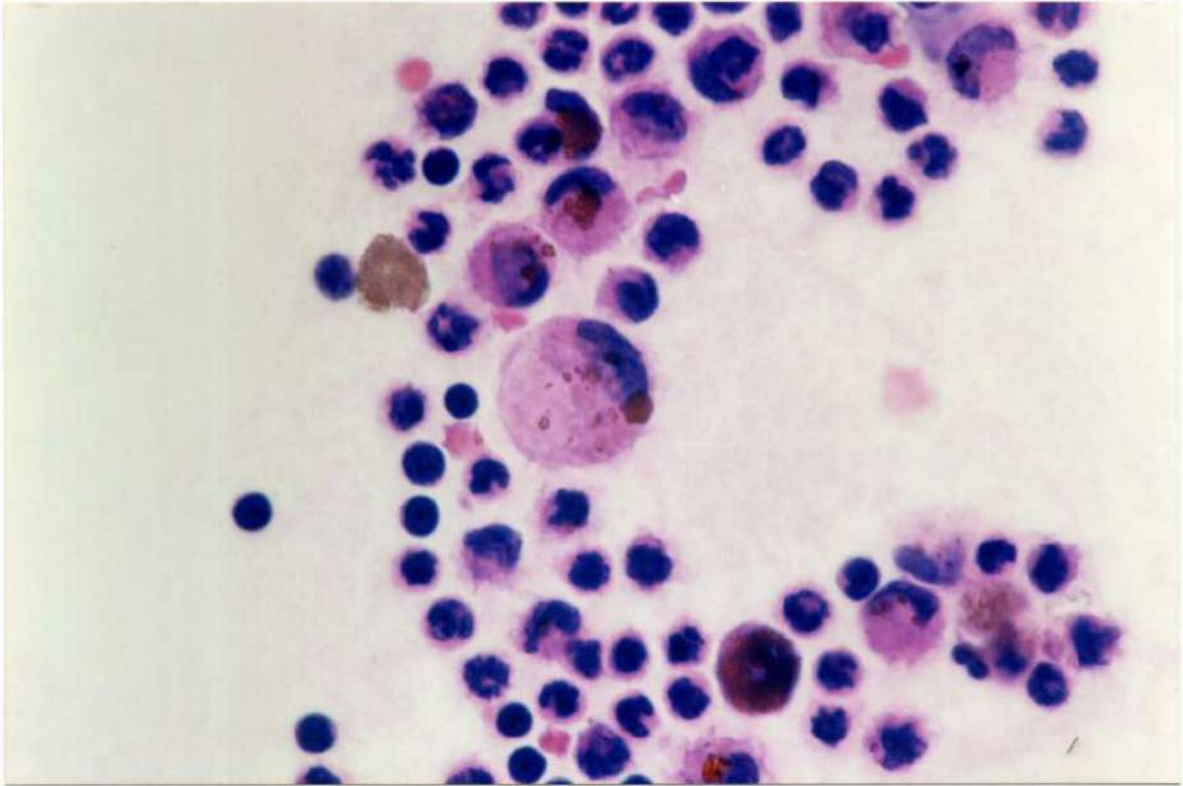
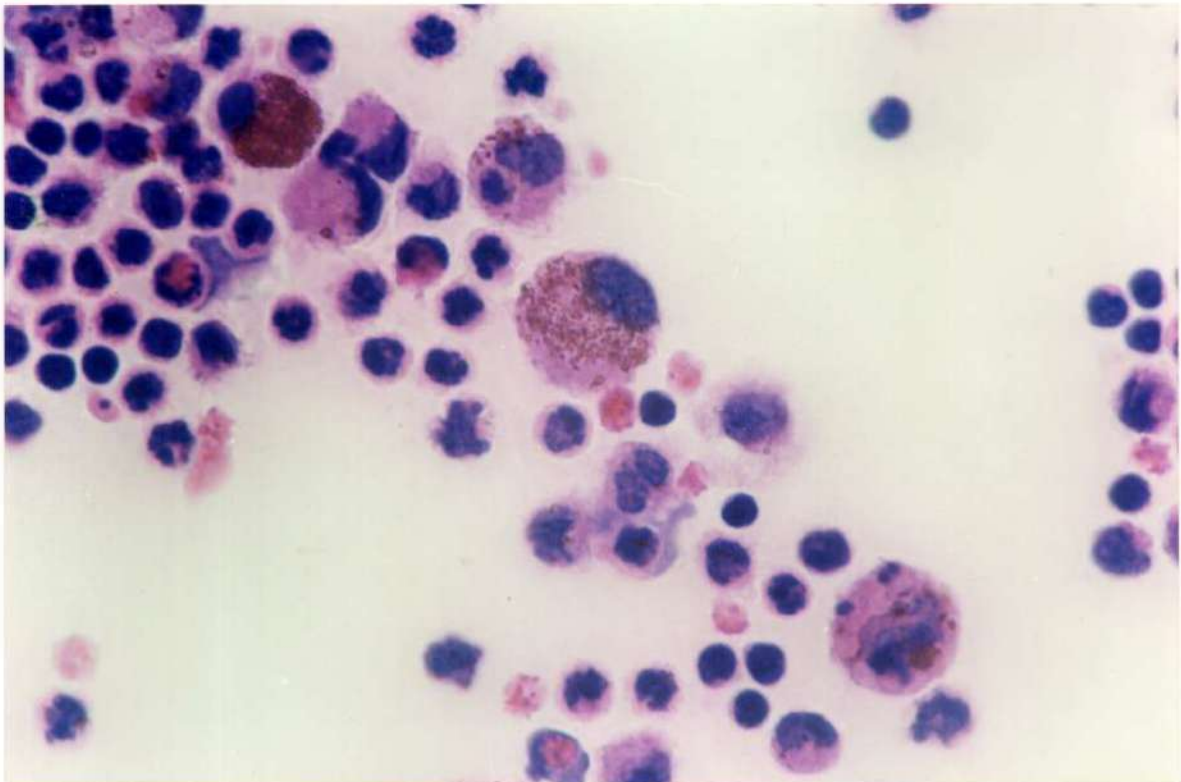


Fig. 43: Mayor magnificación de la Fig. 42. Es evidente la presencia de partículas en el citoplasma de los macrófagos peritoneales. Se observan linfocitos y neutrófilos. Dos campos. Mag. Orig. X1000. H-E.



Para confirmar el material contenido dentro de los macrófagos, se realizó sobre las muestras el análisis con EDAX, cuyo espectro demostró la presencia de titanio (Figs. 44,45).

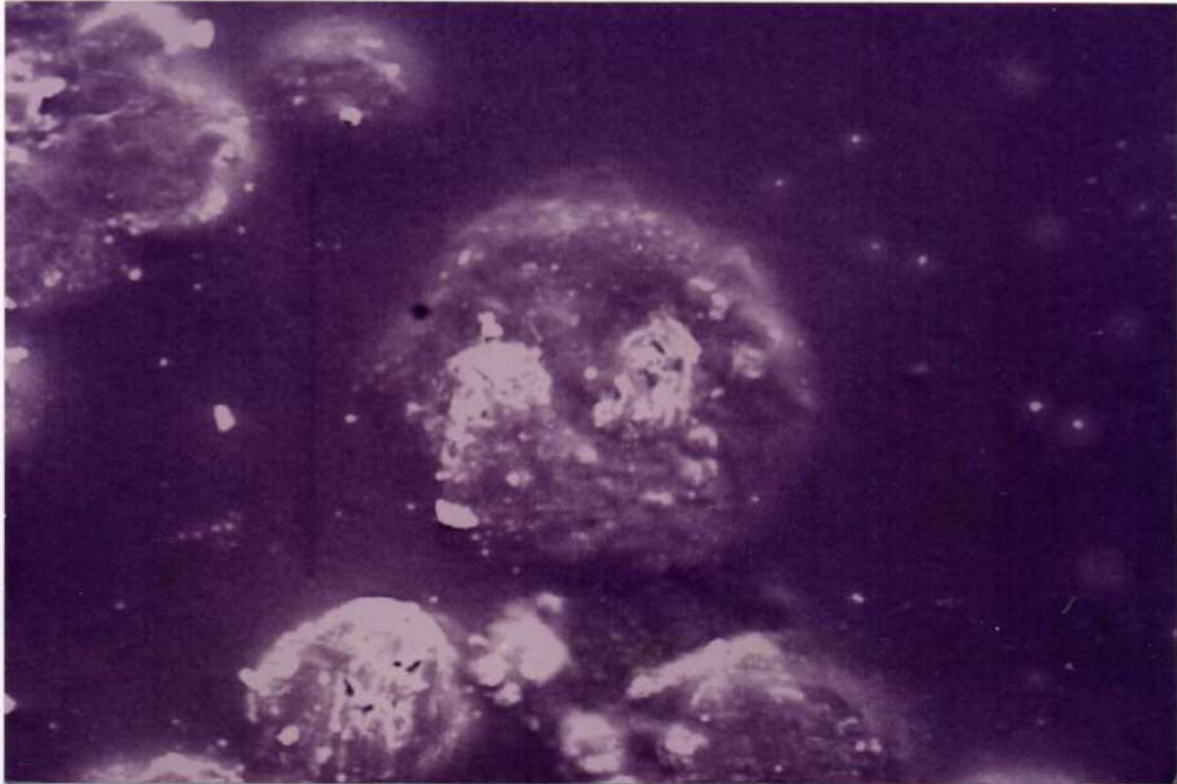


Fig. 44: Microscopía electrónica de barrido que muestra el material fagocitado por macrófagos sobre el cual se realizó el análisis con EDAX.

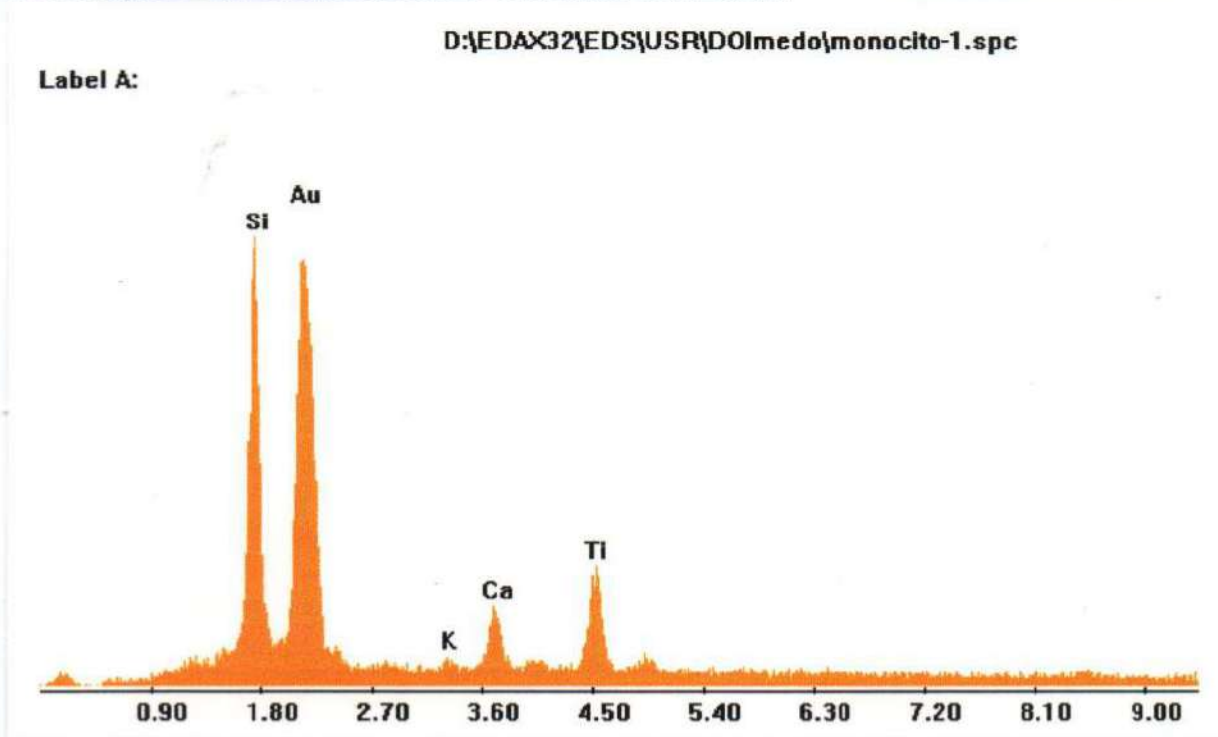


Fig. 45: Se detectó la presencia de titanio en las partículas fagocitadas por los macrófagos. EDAX..



Resultado del estudio histológico de los extendidos sanguíneos

Tanto a los 3 como a los 6 meses fue posible observar en los extendidos la presencia de células de la línea fagocítica-mononuclear con su citoplasma cargado con partículas (Fig. 46).

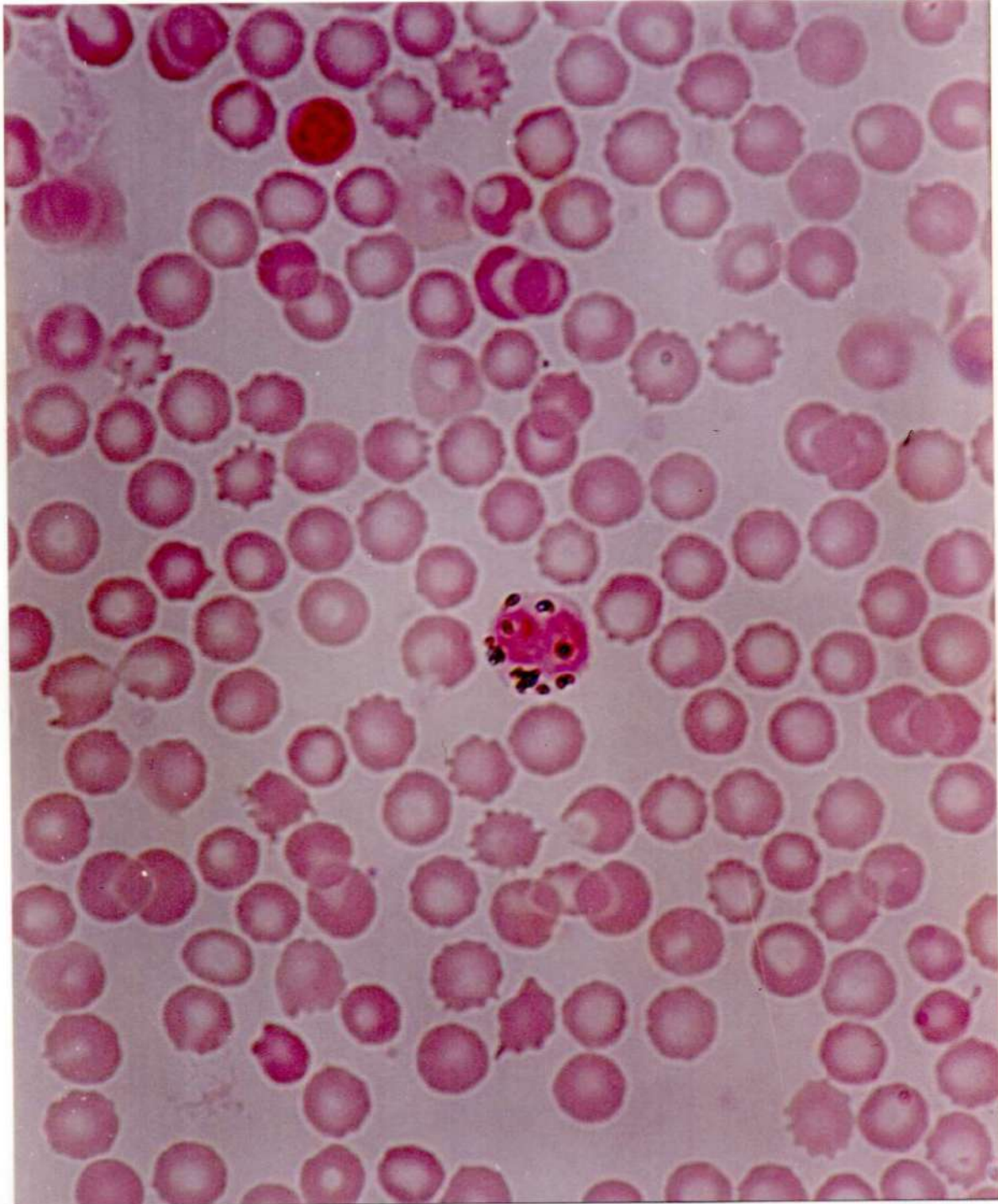


Fig. 46: Obsérvese la presencia de una célula de la línea fagocítica mononuclear mostrando partículas en su citoplasma.

El material adoptó diferentes maneras de depósito intracitoplasmático, en forma difusa, focalizada o distribuida periféricamente (Fig. 47).

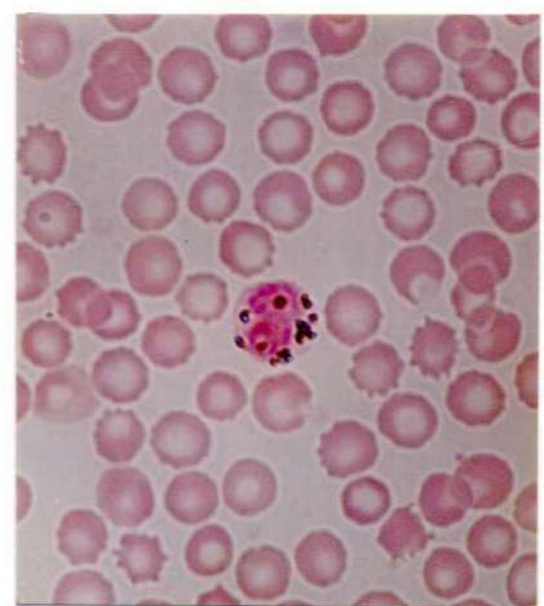
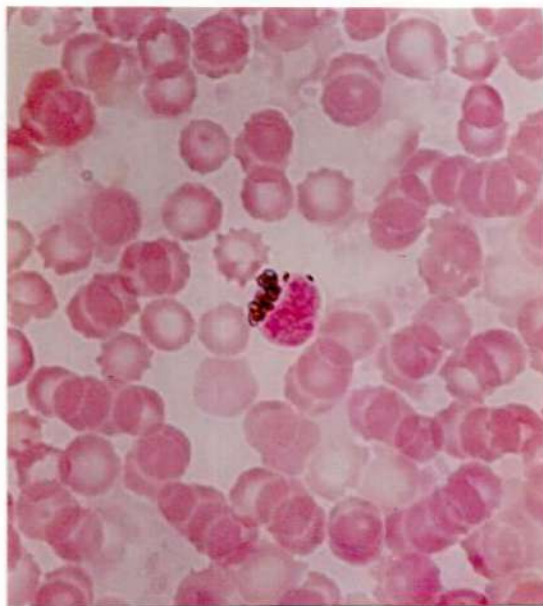
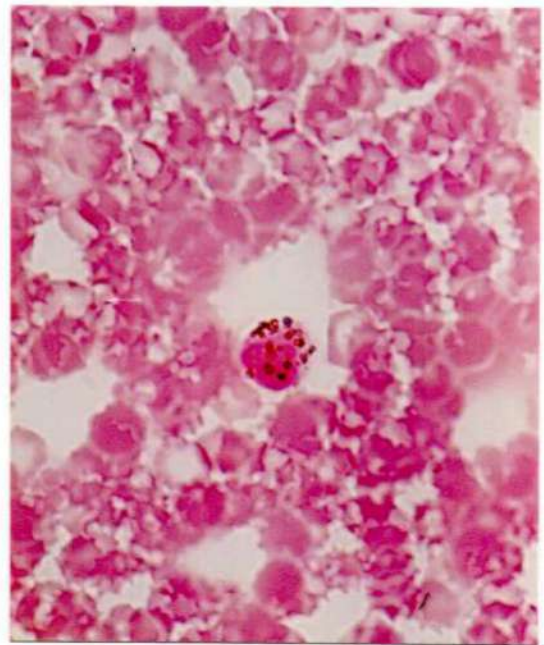
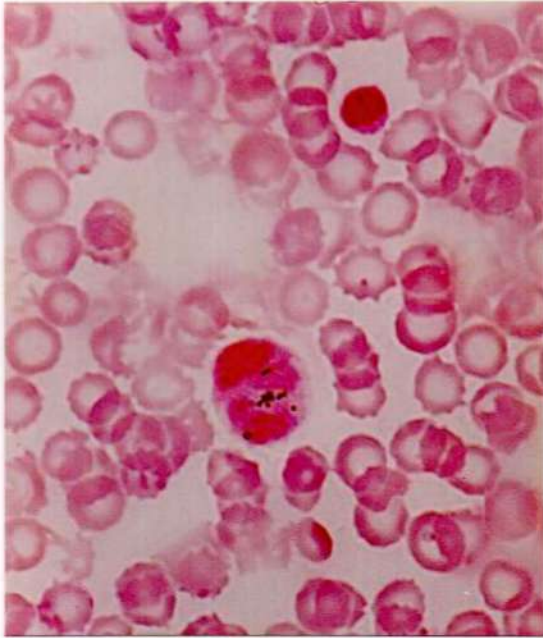


Fig. 47: Extendidos sanguíneos en los que se evidencian células de la línea fagocítica mononuclear con material en su citoplasma. Obsérvese la distribución que adopta el depósito en la célula. Mag. Orig. X1000. Coloración con safranina.

DISCUSION

La corrosión de los metales se consideraba un hecho cotidiano y tan asumido por el ser humano que pasaba desapercibido o aceptado como irremediable. Actualmente el enfoque está cambiando y a pesar de que el problema de la corrosión existe, dado que es prácticamente inevitable, el desafío consiste en tratar que el proceso se detenga o sea más lento y que la vida útil de los metales se alargue. El control de la corrosión está dado por un lado por su interés científico, y por otro, por la necesidad de evitar las grandes pérdidas económico-financieras que la corrosión trae aparejada. El costo de la corrosión es importante, y ha llevado a que numerosos países se vieran obligados a controlar dicho proceso y definir legislaciones al respecto a fin de disminuir su impacto. Por otro lado, los metales son recursos no renovables, y el suministro de algunos de ellos se está volviendo crítico. Además la corrosión suele ser causa de contaminación ambiental.

Un tema de interés en el que la corrosión es inaceptable y en el que debe llegarse a valores despreciables, es el caso de los implantes metálicos utilizados en el ser humano, en los que está en juego la salud del paciente (58). En tal sentido la corrosión debería ser estudiada por un equipo interdisciplinario (químicos, físicos, ingenieros, metalurgistas, especialistas del área biomédica, biólogos, electroquímicos, entre otros) para su comprensión y posible solución. Los especialistas en corrosión se ven en la necesidad de tener que predecir el comportamiento a largo plazo de los materiales, basado en ensayos relativamente cortos (58).

La corrosión de los materiales metálicos utilizados para la fabricación de implantes, es un tema de gran interés en la ciencia de los biomateriales. Debido a que la demanda en el uso de metales para la fabricación de implantes con fines médicos aumenta día a día, el manejo y control de la corrosión es un problema crucial desde un punto de vista biológico y económico.

Ningún metal o aleación es completamente inerte en los seres vivos. El titanio o sus aleaciones fueron en algún tiempo considerados inertes (72,73). Sin embargo, siempre ocurren interacciones entre el metal y su bioentorno. La corrosión es uno de los procesos más importantes que ocasionan problemas cuando los metales son utilizados como implantes en el ser humano (74,75). La corrosión electrolítica es el tipo de corrosión que se produce cuando el metal contacta con los tejidos, ya que existe un transporte simultáneo de iones a través de un electrolito. En el organismo vivo ese medio acuoso o electrolito está provisto por los fluidos orgánicos. Los principales electrolitos de los fluidos extracelulares son básicamente Na^+ y Cl^- en una solución al 0.9 %. El pH medio es 7.4, siendo el ión cloruro el más agresivo para los implantes en el organismo (76). El efecto de los fluidos orgánicos sobre los implantes y de éstos sobre los tejidos es de fundamental importancia. Se conoce que los cambios en el microentorno peri-implante pueden guiar a la corrosión del implante. En los tejidos traumatizados se han observado descensos significativos de pH, determinándose valores tan bajos como 4 durante el proceso de cicatrización de heridas (77). Estos valores de pH persisten hasta que se organizan los coágulos y, mientras tanto, puede aumentar en gran medida la agresividad de los tejidos para los materiales metálicos. También procesos patológicos locales pueden disminuir el pH agravando el problema y

consecuentemente ser un mecanismo estimulador de la corrosión. Estas situaciones traen aparejadas el pasaje lento y constante de iones metálicos a los tejidos peri-implantarios, pero justamente por ser un proceso lento abre la posibilidad de fracasos mediatos de implantes, sean éstos dentales u ortopédicos.

Una de las exigencias básicas que debe reunir un implante metálico que va a ser colocado en el organismo es, además de la compatibilidad con los tejidos, la elevada resistencia a la corrosión. La eficacia de los implantes ante la corrosión depende de la resistencia a la ruptura de la capa de pasivación, pues la causa principal de fracasos en los implantes son los fenómenos de corrosión local: picaduras, corrosión en rendijas, corrosión por fricción y roturas por corrosión fatiga (56).

Debido a que los productos de corrosión pueden resultar tóxicos para los tejidos el valor protector de las capas pasivantes de óxidos debe ser capaz de frenar la velocidad de corrosión hasta niveles aceptables (56).

Bessho y colaboradores (70) describieron un tipo de corrosión localizada, corrosión por picado, en placas metálicas de titanio utilizadas para a reducción de fracturas mandibulares. Los autores observaron ese tipo de corrosión 24 meses después de la implantación de las mismas. La corrosión por picado es la forma más perjudicial bajo la cual se puede presentar la corrosión. En estos casos de ataque localizado, la cantidad de material corroído no guarda relación con la magnitud de los inconvenientes que puede causar. Durante el picado el ataque se localiza en puntos aislados de la superficie metálica pasiva, propagándose hacia el interior del metal. La iniciación del proceso de picado se produce fundamentalmente por la exposición de una pequeña zona de la

superficie metálica a los iones cloruro, siendo éste el ión más agresivo para los implantes metálicos en el organismo. En nuestro estudio fue posible reproducir por medio de ensayos electroquímicos de corta duración la misma corrosión por picado que fue observada por Bessho y colaboradores. Los sitios en donde se inicia la picadura no están bien definidos, pero algunas localizaciones posibles la constituyen por ejemplo las heterogeneidades de la superficie (defectos de la capa de óxido, inclusiones), rayaduras o zonas donde existen variaciones del microentorno (56).

En nuestra experiencia fue posible observar, por medio de microscopía electrónica de barrido, el inicio de las picaduras en zonas donde existían rayaduras superficiales.

El proceso de corrosión del metal puede afectar el íntimo contacto del implante con el tejido óseo. El fracaso más importante a largo plazo, es sin duda la alteración de la oseointegración, que se puede producir después de cierto tiempo. En la práctica se ha demostrado que puede haber una oseointegración inicial y completa, en una primera etapa, pero por contaminación inicial o inadecuado tratamiento de superficie, puede desarrollarse a posteriori un proceso de pérdida de la misma. Aquí, además de factores inherentes a la fabricación, participaría el proceso de corrosión, el que no puede obviarse dado que los iones metálicos pasan a los compartimentos vecinos, cualquiera sea la condición del implante. En nuestro estudio, los implantes con corrosión por picado mostraron un porcentaje de oseointegración significativamente menor comparado con los casos controles. El tejido óseo sólo se oseointegró en aquellas zonas donde el metal permaneció pasivado, es decir, sin picaduras, hecho que explica esa disminución en la oseointegración. El volumen de tejido

óseo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados, indicando que la cantidad de tejido óseo neoformado alrededor del implante fue equivalente en ambos casos.

Además de la pérdida de la oseointegración, a nivel de los tejidos peri-implantarios se observó histológicamente la presencia de subproductos de corrosión libres o fagocitados por macrófagos. Subproductos que fueron confirmados con el análisis por dispersión de rayos X (EDX). En varios casos los depósitos se concentraron alrededor de los vasos sanguíneos, hallazgos que coinciden con los reportados por Meachim y Williams, en el estudio histológico de tejido blando adyacente a diferentes implantes de titanio (50).

Bessho y colaboradores (70) en su análisis de placas de reconstrucción mandibular encontraron corrosión por picado. Los efectos locales adversos producidos por este tipo de corrosión y observados en el presente estudio indicarían que no sería conveniente utilizar placas de titanio como estructuras de fijación permanente. Estos datos tendrían valor también en reconstrucciones o fijaciones ortopédicas. Se propone realizar estudios a largo plazo para garantizar la seguridad del material y evitar fracasos futuros.

Los clásicos estudios de Ferguson y colaboradores (78) y Laing y colaboradores (79) en los años 60 sobre la liberación de iones como consecuencia del proceso corrosivo, demostraron que es una situación desfavorable para los tejidos, no sólo a nivel local sino sistémico. Estos autores implantaron cilindros metálicos en músculo de conejo y realizaron posteriormente el análisis químico de los tejidos, localmente y en órganos distantes. Ferguson y Laing encontraron niveles locales elevados de níquel, cromo y cobalto alrededor de implantes de acero inoxidable. Otros autores

(62,73,80) han descripto la presencia de iones metálicos alrededor de implantes metálicos, utilizando fundamentalmente técnicas especiales para su determinación. Para el caso particular del titanio, Meachin y Williams, Ducheyne y colaboradores y Willens y colaboradores (50,81,82) encontraron niveles altos de este elemento localmente.

Las reacciones celulares y moleculares de la médula ósea ante el titanio no son bien conocidas. Las células en la interfase médula-implante, pueden estar directamente expuestas a iones o partículas liberadas desde la superficie del metal (38). Este hecho fue confirmado en el presente estudio al evaluar el tejido peri-implantario en los implantes con corrosión por picado. Hillman y Donath (83) encontraron macrófagos cargados de partículas de titanio ingresando a los vasos sanguíneos próximos a los implantes de titanio en humanos. En nuestra experiencia detectamos la distribución peri-vascular de los subproductos, ya sea en el citoplasma de los macrófagos o dispersos en el tejido.

En la literatura se informa sobre la presencia de macrófagos o tejido de granulación en la vecindad de prótesis fracasadas sean éstas ortopédicas u odontológicas (64,66, 84). Varios estudios han reportado que las partículas de polietileno, metálicas y de cemento resultantes del desprendimiento de prótesis coxofemorales, pueden ser fagocitadas por macrófagos y estimular la liberación de mediadores inflamatorios conocidos como citoquinas. Las mismas son liberadas hacia la superficie ósea, contribuyendo a su reabsorción, mediante la activación de osteoclastos. Por otra parte, la presencia de polietileno como así también de partículas metálicas, pueden suprimir directamente la función del osteoblasto, por lo tanto no sólo puede haber un

aumento en la reabsorción ósea sino también una disminución en la formación ósea, resultando finalmente en una osteolisis (85,86).

Los iones metálicos químicamente activos, productos de un proceso de corrosión, pueden permanecer asociados a los tejidos circundantes, como fue observado en el presente estudio en el tejido peri-implante de implantes con corrosión por picado. También se describe que estos iones pueden unirse a proteínas, ser transportados en el torrente sanguíneo y linfático y desde allí, a órganos alejados (62).

Varios investigadores han estudiado la problemática de la distribución sistémica de metales en órganos de la economía como Ferguson y colaboradores (60,78) y Laing y colaboradores (79). Estos autores realizaron estudios sobre la concentración de iones metálicos, encontrando altos niveles de níquel en hígado, bazo y pulmón y de cobalto en riñón y pulmón. Asimismo reportaron altos niveles de titanio en bazo y pulmón de animales con implantes de titanio. Woodman y colaboradores (62), también encontraron la presencia de altos niveles de titanio en pulmón, bazo e hígado como así también en los nódulos linfáticos regionales. Por otra parte, describieron un progresivo aumento de aluminio contenido en pulmones.

En todos estos casos la determinación de iones metálicos en los tejidos se determinó por medio de técnicas especiales (espectrofotométricas).

R.M. Urban y colaboradores demostraron la presencia de partículas metálicas y plásticas provenientes de prótesis coxofemorales y de reemplazo de rodilla en órganos como hígado, bazo y ganglios linfáticos estudiados en 27 autopsias (64). En el presente trabajo se presentó un modelo experimental donde confirmamos que el dióxido de titanio se movilizó y depositó en hígado, bazo y

pulmón, hecho que fue demostrado a través de su estudio microscópico, dato rescatable, dado que hasta el presente se había evaluado por análisis químico. Una consideración puramente termodinámica haría poco probable suponer que iones metálicos producidos por el proceso corrosivo se introduzcan en la célula, se reduzcan a metal y se visualicen a nivel microscópico. Se podría pensar que la introducción de iones en las células macrofágicas desencadenaría reacciones capaces, en una primera etapa, de complejar los iones metálicos a proteínas o glicoproteínas, formando partículas observables microscópicamente. Esto es un hecho habitual en el metabolismo normal del hierro por la formación de gránulos de hemosiderina en la médula ósea o en el bazo. La forma habitual de depósito de los metales se relaciona asociada a la presencia de glicoproteínas, lo que fue confirmado en este estudio por la positividad a la reacción PAS en los macrófagos de los órganos analizados (87).

Es importante destacar del estudio microscópico de los órganos analizados, la presencia de partículas de titanio en pulmón. La toxicología del titanio no ha sido aún bien estudiada; la mayoría de los estudios epidemiológicos han encontrado que la inhalación de polvo ambiental conteniendo titanio no ejerce efecto deletéreo en el organismo (88,89) pero otros estudios han sugerido la asociación de partículas de titanio con patología de pleura (90), enfermedades granulomatosas y neoplasias malignas de pulmón (91). La presencia de titanio en pulmón sería de interés ya que la detección de titanio en este órgano podría ser estudiada mediante su exploración en casos clínicos y ser eventualmente de valor diagnóstico como indicador de procesos de corrosión .



Es notable el hecho de haber comprobado en nuestro estudio, que el dióxido de titanio se depositó como tal en los órganos estudiados, conservando las mismas características cristalográficas (anatasa). Por lo tanto el material fue transportado como tal desde el sitio de inyección, sin sufrir ninguna modificación química, datos no descriptos en la bibliografía.

Los efectos de algunos metales en los tejidos son bien conocidos. En algunos casos cuando los iones son lo suficientemente tóxicos, como ocurre con el uranio (92), producen en algunas células target lesiones muy variables que pueden llevar a una necrosis celular, tal es el caso del uranio que a una dosis de 2mg/Kg de peso corporal induce la muerte activa de las células de los tubos contorneados proximales del riñón. La introducción en el tejido de sales de compuestos de uranio provocan la eliminación de iones que una vez vehiculizados llegan al riñón y producen su efecto deletéreo. Este proceso en el sentido de vehiculización de iones podría darse en los metales que constituyen un implante.

Se han descrito diferentes manifestaciones producidas por la liberación de iones de titanio, entre otras: a) Linfadenopatías como posibles consecuencias de la migración de partículas de desgaste desde los implantes coxofemorales hacia los nódulos linfáticos regionales, potencialmente involucrando la liberación de iones metálicos (93,94) y b) Efectos sistémicos caracterizados por sensibilización debido a la interacción del cuerpo con iones metálicos liberados por el proceso corrosivo (80,95).

Aunque no hay demasiados datos de producción de neoplasias por iones metálicos, y especialmente con el titanio, el hecho no es absolutamente descartable. Se estableció una correlación entre la presencia de titanio y la

coexistencia de neoplasias malignas, tal es el caso de neoplasias del sistema linfático y hematopoyético (96,97) y la presencia de titanio en el osteoide en un caso de un osteosarcoma osteoblástico maligno (98,99).

No se evidencia correlación entre los hallazgos clínicos descritos y el número de implantes; no obstante, es prudente un seguimiento a largo plazo de los pacientes portadores de los mismos. En los implantes coxofemorales el monitoreo de niveles de iones a nivel sistémico es una ventaja ya que puede ser indicador de movilidad y secuelas a distancia (100).

En nuestro trabajo el dióxido de titanio se movilizó activamente en el cuerpo, pero no parece que el depósito desencadene fácilmente cuadros granulomatosos en períodos cortos. Es claro que la difusión de metales de los implantes, sean estos ortopédicos u odontológicos, no se limitaría a un problema local, sino que existe un depósito en órganos clave cuya evolución proporciona un marco de interés y un interrogante para futuros estudios.

Como fue expresado anteriormente, el dióxido de titanio inyectado en el peritoneo de la rata, se depositó como tal en órganos blanco estudiados, conservando las mismas características cristalográficas (anatasa).

Esto nos indica que el TiO_2 no sufrió cambios químicos en su composición, es decir que el titanio no fue separado de su unión con el oxígeno, sino que fue vehiculizado como tal (anatasa) desde su sitio de inyección. Esto indicaría que el transporte del compuesto TiO_2 no se llevaría a cabo por medio de proteínas plasmáticas, como ocurre con otros metales. En tal sentido, es probable que la forma de transporte sea por medio de macrófagos. Así el TiO_2 inyectado en el peritoneo de la rata, podría haber sido fagocitado como tal por macrófagos, transportado desde el sitio de inyección por vía linfática y finalmente volcado a

circulación sanguínea. De esta manera el estudio de los extendidos sanguíneos reveló la presencia de células de la línea fagocítica mononuclear con su citoplasma cargado con partículas.

Existen en la bibliografía varios estudios sobre la unión de metales a células y proteínas que ayudan a explicar la diseminación de productos de corrosión desde el sitio de implantación. Para metales como níquel, cromo y cobalto se describen como medios de unión y transporte a células de la sangre y/o proteínas, especialmente la albúmina, la proteína más abundante en el suero y fluidos tisulares (101,102). Para el aluminio se asocia su transporte a transferrina (103). El uranio se transporta 50% unido a proteínas, 50% citratos y 50% a carbonatos (92). El hecho que los metales se unan fundamentalmente a la albúmina explicaría la amplia distribución de ellos en el organismo; de esta manera los iones metálicos resultantes de un proceso de corrosión pasarían a los tejidos, se unirían a la albúmina y entrarían a la circulación produciendo efectos alejados al sitio donde se encuentra la estructura metálica del implante. Para el caso particular del titanio, se conoce poco acerca del estado de valencia con el cual interactúa, la naturaleza orgánica o inorgánica de sus ligandos, y su potencial toxicidad (63). En nuestro estudio pudimos comprobar el transporte de titanio en sangre por medio de células. Ciertamente ésta es una de las formas por las cuales el titanio puede ser vehiculizado, ya que, al igual que otros metales, podría ser transportado por proteínas plasmáticas, situación que no fue analizada en este estudio. Existen en la bibliografía estudios de detección de iones de titanio por medio de técnicas espectrofotométricas en fluidos orgánicos, como orina y suero (63,104,105). En nuestro estudio no se aplicaron técnicas espectrofotométricas para el estudio

de la sangre, sino que histológicamente se evidenció la presencia de células con su citoplasma cargado con partículas. La presencia de estas células en la sangre de aquellos pacientes portadores de prótesis (coxofemorales, dentales, placas y tornillos para la reducción de fracturas, planchas metálicas para la reconstrucción de grandes zonas) sería de gran importancia pues indicaría indirectamente la presencia de algún proceso de corrosión de las estructuras metálicas.

El estudio de las superficies metálicas del implante puede dar datos que hagan presumible diferentes condiciones de corrosión, aunque hay muchos casos en donde es difícil una definición para estimar etapas y causas.

La evidencia de la corrosión en la superficie de los implantes ha sido descrita por Luthy (52) al analizar implantes fracasados "exfoliados". Lemons (53,54) y Adell et al (55) han considerado la importancia de monitorear en forma continua la corrosión de los implantes.

En este estudio el efecto de la corrosión fue también evaluado en el tejido blando peri-implante de implantes dentales humanos fracasados que histológicamente presentaban la presencia de macrófagos. Los mismos revelaron, por medio del estudio con EDX, partículas metálicas de titanio en su citoplasma. Es discutido en la literatura que los productos de corrosión del implante metálico se comportan como haptenos y puedan generar una reacción de hipersensibilidad de tipo IV mediada por células, la cual sensibilizaría linfocitos B con la posterior liberación de citoquinas que finalmente resultaría en el reclutamiento de macrófagos (95,106,107,108). Esto podría explicar en parte la presencia de los macrófagos encontrados en el tejido blando peri-implante de los implantes dentales fracasados. Otro tema aún no definido es si la

hipersensibilidad al metal es la que ocasiona el fracaso de un implante o viceversa (95,109).

En un estudio previo hemos demostrado, in vivo e in vitro, que el descenso de pH del electrolito acelera el proceso de corrosión del titanio (110). Un dato aún no completamente comprendido es, si un proceso inflamatorio, con su consecuente disminución de pH, es el responsable de la aparición de un proceso de corrosión, o viceversa, si ante un proceso de corrosión se desencadena un proceso inflamatorio. Sea cual fuere el mecanismo, lo cierto es que en el análisis del tejido blando peri-implante fue posible encontrar la presencia de macrófagos con su citoplasma cargado con partículas de titanio. Hemos determinado el número de macrófagos, estableciéndose un índice de presencia de macrófagos mediante una metodología para estandarizar este hecho. Un dato de interés es que el número de macrófagos encontrado en la cercanía de la superficie metálica de los implantes estudiados fue mayor a aquél encontrado en zonas alejadas de la superficie. Esto indicaría que la concentración de iones metálicos liberados, debido al proceso de corrosión del metal, sería inversamente proporcional a la distancia al metal. El índice de presencia de macrófagos aporta datos numéricos que permiten cuantificar macrófagos cargados con partículas en la interfase metal-tejido, y podría ser aplicable en el estudio de tejidos adyacentes a implantes dentales, ortopédicos u otros. Los datos aportados por el índice, ofrecen cierto valor para postular las probables causas del fracaso de implantes teniendo en cuenta que por sí solo no es un dato determinante, sino complementario.

En este estudio, por un lado nos encontramos ante la respuesta local del tejido en relación al implante metálico y por el otro ante la presencia de corrosión del

mismo. La aparición de macrófagos cargados con partículas metálicas de titanio en el tejido blando peri-implante sería un indicador de un proceso de corrosión y de alguna manera permite estimarlo. En tal sentido, los fenómenos de corrosión en la interfase metal tejido son de especial importancia en la evolución de los implantes tanto odontológicos como ortopédicos.

Si bien el titanio es uno de los metales más biocompatibles actualmente utilizados en implantología, en el organismo no es completamente inerte, y el problema de la corrosión existe. Las futuras perspectivas en la fabricación de implantes apuntan a desarrollar métodos que ayuden a reducir la difusión de los metales desde los implantes a los tejidos, con el fin de minimizar el problema de la corrosión.

Es necesaria la investigación interdisciplinaria a fin de abordar y dar soluciones conjuntas a la problemática de la corrosión de metales, especialmente en el área biomédica. Teniendo en cuenta que la prevención de las patologías constituye la principal protección para la salud del paciente.

CONCLUSIONES

En base a los hallazgos observados en el presente trabajo de tesis, se concluye:

- El titanio utilizado como material para implantes no es completamente inerte en el cuerpo. La corrosión del mismo trae aparejada el pasaje lento y constante de iones metálicos a los tejidos peri-implantarios. Este hecho abre la posibilidad de fracasos mediatos de implantes dentales, ortopédicos u otros.
- La presencia de superficies metálicas corroídas y los iones metálicos resultantes de dicho proceso alteran la oseointegración.
- El proceso de corrosión lleva a la degradación "in situ" del metal, alterando consecuentemente su integridad estructural.
- No sería conveniente utilizar placas de titanio como estructuras de fijación permanente; por lo cual se propone realizar estudios a largo plazo para garantizar la seguridad del material y evitar fracasos futuros.
- La corrosión del metal conlleva a la liberación de subproductos de corrosión que pueden acumularse localmente en el lecho peri-implantario, y/o diseminarse por vía sistémica.

- La presencia de macrófagos en el tejido blando adyacente a implantes humanos fracasados, puede ser cuantitada mediante un índice, ofreciendo datos complementarios para postular probables causas de fracaso.
- El titanio se deposita en órganos blanco, como hígado, bazo y pulmón, posibilitando el estudio de este depósito en estos órganos a largo plazo.
- La presencia de partículas de titanio en pulmón es de gran importancia ya que la detección de ese elemento en ese órgano podría ser estudiado mediante su exploración en casos clínicos y ser eventualmente de valor diagnóstico y predictivo de procesos de corrosión.
- Una de las formas en el que el titanio es transportado en sangre, es por medio de células de la línea fagocítica mononuclear.
- La presencia en sangre de células de la línea fagocítica mononuclear cargadas con partículas metálicas de titanio, sería de interés pues su detección tendría valor diagnóstico, como indicador de un proceso de corrosión.
- Es necesaria la investigación interdisciplinaria a fin de abordar y dar soluciones conjuntas a la problemática de la corrosión de metales, especialmente en el área biomédica. Teniendo en cuenta que la prevención de las patologías constituye la principal protección para la salud del paciente.

Estos hallazgos dejan abierta la posibilidad para estudios futuros que ayuden a comprender los mecanismos íntimos ligados al proceso de corrosión, especialmente en aquellos metales que serán utilizados para la fabricación de implantes, los que en última instancia estarán en contacto con los tejidos vivos.

RESUMEN

Los implantes metálicos de titanio son utilizados terapéuticamente en el área biomédica, debido a su excelente biocompatibilidad, explicada por la formación de una capa de óxido (TiO_2) que determina la respuesta biológica. Sin embargo, dentro de las posibles causas de fracaso, la corrosión ocupa un destacado lugar, ocasionando la degradación del implante y la liberación de subproductos que pueden causar una reacción adversa a nivel local y/o sistémico. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de los tejidos por el efecto de la corrosión del titanio. Localmente, se estudió experimentalmente por medio de implantes de titanio con corrosión por picado y en el tejido blando adyacente a implantes dentales humanos fracasados. Para el estudio del efecto sistémico se utilizó un modelo donde el TiO_2 se inyectó intraperitonealmente evaluándose su destino final y su medio de transporte.

Los implantes con corrosión por picado mostraron una disminución significativa en la oseointegración y la presencia de subproductos de corrosión en el lecho peri-implantario. A nivel sistémico se demostró el depósito en órganos blanco como hígado, bazo y pulmón, y su transporte por células sanguíneas de la línea fagocítica mononuclear.

La corrosión lleva al deterioro del metal modificando su integridad. El pasaje de iones altera la oseointegración y a nivel sistémico se depositan en órganos blanco. La detección de la presencia de titanio en pulmón y/o en células de la sangre sería de gran valor diagnóstico.

Es necesaria la investigación interdisciplinaria de la corrosión, especialmente en el área biomédica.



SUMMARY

Titanium implants are widely used in biomedicine for therapeutic purposes because of their excellent biocompatibility. The latter has been attributed to the formation of an oxide layer (TiO_2), which induces the biological response. However, one of the major causes of implant failure is corrosion, since it causes degradation of implant material and the consequent release of corrosion products that may cause local and/or systemic adverse effects. The aim of this study was to evaluate tissue response to titanium corrosion. Local tissue response to corrosion was evaluated in an experimental model using implants exhibiting pitting corrosion, and in soft tissues surrounding failed dental human implants. Systemic response was studied experimentally using intraperitoneal TiO_2 injections to identify the target organs and transport routes.

Experimentally corroded implants showed significantly lower osseointegration and the presence of corrosion products in the implant bed. The systemic study revealed Ti deposits in target organs such as liver, spleen, and lung; corrosion products were found to be transported in mononuclear phagocytic blood cells.

Corrosion causes metal degradation. The leakage of ions impairs osseointegration and these corrosion products are deposited in target organs. Detection of titanium in the lung and/or blood cells would be a useful diagnostic tool to monitor the condition of the implant. Interdisciplinary research on corrosion is necessary, especially in the biomedical field.

Bibliografía

1. Burke J et al. Application of Materials in Medicine and Dentistry. In: Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine. Ed. Ratner, Hoffman, Schoen, Lemons. 1996 Chapter 7, p. 283.
2. Albrektsson T, Bränemark P-I, Hansson H-A, Lindström. J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 1981; 52: 155-170.
3. Albrektsson T, Zarb GA. Current interpretations of the osseointegrated response: clinical significance. *Int J Prosthodont* 1993; 6: 95-105.
4. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants. A review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986; 1: 11-25
5. Lautenschläger EP, Sarker NK, Acharya A, Galante JO, Rostoker W. Anodic polarisation of porous metal fibers. *J Biomed Mater Res* 1974; 8: 189-191.
6. Rae T. The biological response to titanium and titanium-aluminium-vanadium alloy particles. *Biomater* 1986; 7: 30-36.
7. Solar RJ, Pollack SR and Korostoff E. In vitro corrosion testing of titanium surgical implant alloys: an approach to understanding titanium release from implants. *J Biomed Mater Res* 1979; 13: 217-250.

8. Cabrini RL, Guglielmotti MB. Aspectos biológicos da osseointegracao-sua importancia na implantologia. En: Actualizacao na Clínica Odontológica a prática da clínica geral. Editorial Livraria Editora Artes médicas Ltda. Capítulo 8, pág. 163-173.
9. Albrektsson T, Bränemark P-I, Hansson H-A, Kasemo B, Larsson K, Lundström I, McQueen D, Skakak R. The interface zone of inorganic implants in vivo. Titanium implants in bone. Ann Biomed Eng 1983; 11: 1-27.
10. Anderson JM et al. Implants and devices. In: Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine. Ed. Ratner, Hoffman, Schoen, Lemons. 1996 Chapter 9, p. 426.
11. Chérchève, R. Nouveaux aperçus sur le probleme des implants dentaires chez l'edente comple. Implantas et tuteurs. Rev Fr Odont Stomatol. July 1956.
12. Linkow, L. I. Prefabricated endosseous implant prostheses. Dent Concepts 1968; 11:3.
13. Bränemark P-I, Breine V, Lindström J, Adell R, Hansson B-O, Ohlsson P. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. Scand J Plast Reconstr Surg 1969; 3: 81-100.

14. Brånemark P-I. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 1983; 50: 399.
15. Brånemark P-I. Tooth replacement by oral endoprostheses: Clinical aspects. *J Dent Educ* 1988; 52: 821-823.
16. Albrektsson T. Bone tissue response. In: Brånemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T (eds). *Tissue- Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence, 1985: 129-144.
17. Sennerby, L. On the bone tissue response to titanium implants. Thesis, University of Göteborg, Sweden, 1991.
18. Hutton JE, Heath MR, Chai JY, Harnett J, Jemt T, Johns RB, McKenna S, McNamara DC, van Steenberghe D, Taylor R, et al. Factors related to success and failure rates at 3 year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Branemark implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995; 10: 33-42.
19. Espósito M., Hirsch J-M, Lekholm U, Thomsen P. Biological Factors contributing to failures of osseointegrated oral implants(II) Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 721-764
20. Guglielmotti MB, Cabrini, RL. Evaluación biológica de implantes dentales fracasados. *Rev Asoc Odontol Argent* 1997; 85(4): 313-317.

21. Giglio MJ, Giannunzio G, Olmedo D, Guglielmotti MB. A histomorphometric study of bone healing around laminar implants in experimental diabetes. *Implant Dent* 2000; 9: 143-149.
22. Werner SB, Tessler J, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Effect of dexamethasone on osseointegration: a preliminary study. *J Oral Impl* 1996; 22: 216-219.
23. Steinemann SG. Tissue compatibility of metals from physicochemical principles. In: Kovacs P., Istephanous N.S. Ed. *Compatibility of biomedical implants. Corrosion and organic and biological electrochemistry divisions. Proc. Vol. 94-150. Pennington N.J. the electrochemical society. 1994; p 1-13.*
24. Mears DC. Metals in medicine and surgery. *Int Metals Rev* 1977; June: 119-123.
25. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1988; 11: 391-401.
26. Thomsen C, Larsson C, Ericson, LE. Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium. *J Mater Sci Mater Med* 1997; 8: 653-665.

27. Williams DF and Williams RL, in "Biomaterial Science: an introduction to materials in medicine (Academic Press, Inc, 1996) p. 260.
28. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: A reality. *Periodontol* 2000 1998; 17: 22-35.
29. Carlsson L. On the development of a new concept for orthopaedic implant fixation. Thesis, University of Göteborg, Göteborg, Sweden, 1989.
30. Johansson C. On tissue reaction to metal implants. Thesis, University of Göteborg, Sweden, 1991.
31. Larsson C. The interface between bone and metals with different surface properties. Light microscopic and ultrastructural studies. Thesis, University of Göteborg, Göteborg, Sweden, 1997.
32. Bränemark P-I, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Öhman A. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand Reconstr Surg* 1977, II. Suppl 16.
33. Adell R, Lekholm V, Rockler B, Bränemark P-I. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int Oral Surg* 1981; 10: 387-416.

34. Van Steenberghe D, Quirynen M, Calberson L, demanet L. A prospective evaluation of the rate of 697 consecutive intra-oral fixtures ad modum Bränemark in the rehabilitation of edentulism. *J Head Neck Pathol* 1987; 6: 53-58.
35. Albrektsson T. A multicenter report on osseointegrated oral implants. *J Prosthet Dent* 1988; 60: 75-84.
36. Adell R, Ericksson B, Lekholm V, Bränemark P-I, Jemt T. A long-term follow up study of osseointegrated implants in the treatment of the totally edentulous jaw. *Int J Oral Maxillofac Impl* 1990; 5: 347-359.
37. Lekholm V, Van Steenbergh D, Herrmann I, Bolender C, Folmer T, Gunne j, Henry P, Higuchi K, laney WR, Lindeén U. Osseointegrated implants in the treatment of partially edentolous jaws: a prospective 5-year multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Impl* 1994; 9: 627-635.
38. Williams DF. Titanium and titanium alloys. In: Williams DF, (ed): *Biocompatibility of clinical implant materials*. CRC series in biocompatibility, CRC Press Inc, Boca Ratón, Florida 1981; 99-129.
39. Kasemo B and Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: A surface Science Approach. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 3: 247-259.

40. Kasemo B. and Lausmaa J. Prótesis Tejido-Integradas. La oseointegración en la Odontología Clínica. Bränemark, Zarb, Albrektsson. Ed. Quintessence. 1987. Capítulo 4. p. 99-116.
41. Baier R, Meyer A. Implant Surface Preparation. Int J Oral Maxillofac Implants 1998; 3: 9-20.
42. Kasemo B. Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects. J Prosthet Dent 1983; 49: 832-837.
43. Weiländer M. Surface preparation of endosseous implants. In: Endosseous Implants: Scientific and Clinical Aspects. Georg Watzek and others. Quintessence Publishing Co, Inc, 1996. Chapter 4 - p. 101-129.
44. Mc Queen D, Sundgreen B, Ivarsson J, Lundström J, Ekenstam B, Svensson A, Bränemark P-I, Albrektsson T: Auger electron spectroscopic studies of titanium implants. Adv Biomater 1982; 4: 179-185.
45. Gwyniolo AP. Cell biology at interfaces. J Mater Sci Mat Med 1994; 5: 357-360.
46. Wong M, Eulenberger j, Schenk R, Hunziker E. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. J Biomed Mater Res 1995; 29: 1567-1575.

47. Steinemann SG. Titanium-the material of choice? *Periodontol* 2000. 1998; 17: 7-21.
48. Lucas L, Lemons J. Biodegradation of restorative metallic systems. *Adv Dent Res* 1992; 6: 32-37.
49. Schliephake H, Reiss G, Urban R, Neukam FW, Günay H. Freisetzung von Titan aus Schraubenimplantaten *Z Zahnärztl Implant* 1991; 6: 6-10.
50. Meachin G, Williams DF. Changes in nonosseous tissue adjacent to titanium implants. *J Biomed Mater Res* 1973; 7: 55-572.
51. Woodman JL, Black J, Jimenez SA: Chromatographic fraction behavior of organometallic corrosion products from 316SS and HS-21 in vivo and in vitro. *Transactions of the 27th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society* 1981; 6: 207.
52. Luthy H, Strub J, Scharer P. Analysis of plasma flame sprayed coatings on endosseous oral titanium implants exfoliated in man. *Int. J Oral Maxillofac Implants* 1997; 2: 1987.
53. Lemons J. Dental implant retrieval analysis. *Int J Oral Implants* 1998; 5: 41.
54. Lemons J. Dental implants biomaterials. *J Am Dent Assoc* 1990; 121: 716.

55. Adell R, Lekholm V, Rockler B. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1986; 15: 39.
56. Kruger J. Fundamental aspects of the corrosion of metallic implants. *Corrosion and degradation of implants materials*, ASTM STP 684, B.C. Syrett and A. Acharya, Eds, American Society for Testing and Materials, 1979, pp 107-127.
57. Hoar TP, Mears DC. Corrosion resistant alloys in chloride solutions: Materials for surgical implants. *Procr Soc Med* 1979; 13: 217-250.
58. Galvele JR y Duffó GS. Informe técnico 51/95. En *Procesos de Corrosión*. Capítulo 1. Instituto de Tecnología. Universidad Nacional de General San Martín. Comisión Nacional de Energía Atómica.
59. Schliephake H et al. Metal release from titanium fixtures during placement in the mandible: An experimental study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993; 8: 502-511.
60. Ferguson AB Jr, Akahoshi y, Laing PG and Hodge Es. Characteristics of trace ions release from embedded metal implants in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 44-A 1962; 2: 323-336.



61. Solar, RJ. Corrosion resistance of titanium surgical implant alloys: a review. ASTM special technical publication 684, BC. Syrett and A Acharya (eds), U S Food and Drug Admin. ASTM symp Kansas City, Mo 1978; 22-23.
62. Woodman JL, Jacobs JJ, Galante JO, Urban RM. Metal ion release from titanium-based prosthetic segmental replacements of long bones in baboons: a long-term study. *Orthop Res* 1984; 1: 421-430.
63. Jacobs J, Skipor AK, Urban J, Galante RM. Release and excretion of metal in patients who have a total hip replacement component made of titanium base alloys. *J Bone Joint Surg* 1991; 73: 1475-1486.
64. Urban R, Jacobs J, Tomlinson M, Gavrilovic J, Black J and M. Peoc'h M. Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *J Bone and Joint Surg* 2000; 82-A: 457
65. Thompson GJ, Puleo DA. Effects of sublethal metal ion concentration on osteogenic cells derived from bone marrow stromal cells. *J Appl Biomater* 1995; 6: 249-258.
66. Mosberg LE, Nordenram A, Kjellaman O. Metal release from plates used in jaw fracture treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1989; 18: 311-314.

67. Goodman WG. Experimental aluminium-induced bone disease: Studies in vivo. *kidney International* 1986; 18: 32-36.
68. Blumenthal NC and Cosma V. Inhibition of apatite formation by titanium and vanadium ions. *J Biomed Mater Res: Applied Biomaterials* 1989; 23 (1): 13-22.
69. McKinney RV, Stefflick DE, Koth DL, Singh BB. Histomorphometry of endosteal implant-tissue interfaces. *J Dent Res* 1985; 64: 299-308.
70. Bessho K, Fujimura K and Iizuka T. Experimental long-term study of titanium ions eluted from pure titanium miniplates. *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 901-905.
71. Cabrini RL, Guglielmotti MB, Almagro JC. Histomorphometry of initial bone healing around zirconium implants in rats. *Implant Dent* 1993; 2: 264-267.
72. Bote RT, Beato KE, Devanaron HA. Reaction of bone to multiple metallic implants. *Surg Gynecol Obstet* 1940; 71: 598-602.
73. Leventhal GS. Titanium. A metal for surgery. *J Bone Int Surg* 1951; 33 A: 473-474

74. Bement AL. Biomaterials: Bioengineering Applied to Materials for Hard and Soft Tissue Replacement, Battelle Seattle Research Center University of Washington Press, Seattle and London, 1971.
75. Colangelo VJ, Greene ND. Corrosion and fracture of type 316 SMO orthopedic implants. *J Biomed Mater Res* 1969; 3:247-265.
76. Bardos DI. Handbook of stainless steel. Ed. D. Peckner e I.M. Bernstein. McGraw-Hill. Nueva York, St. Luis (1977). Capítulo 42. pp.42. 1-42.10.
77. Laing PG. Compatibility of Biomaterials. *Orthop Clin of NA* 1973;4(2): 249-273.
78. Ferguson AB Jr, Laining PG, Hodge ES. The ionisation of metal implants in living tissues. *J Bone Joint Surg (AM)* 1960; 42: 77-90.
79. Laing PG, Ferguson AB, Jr, and Hodge ES. *J Biomed Mater Res* 1967; 1: 135-149.
80. Van Orden, AC. Corrosive response of the interface tissue to 316 L stainless steel, titanium-based alloy and cobalt-based alloys. In: Mc Kinney, RV; Lemmons JE, eds; *The dental implants clinical and biological response of oral tissues*. Littleton, Massachusetts: PSG publishing Co. 1985.

81. Ducheyne P, Willems G, Martens M and Helsen J. *J Biomed Mater Res* 1984; 18: 293-308.
82. Willems GL, Palmans RA, Colard J, Ducheyne P and Martens M, in *Biomaterials and Biomechanics 1983*, P Ducheyne G. Van der Perre, and AE Aubert, Eds Elsevier, Amsterdam, 1984, pp. 237-242.
83. Hillman G, Donath K. Licht-und elektronenmikroskopische untersuchung zur biostabilität dentaler titanimplantate. *Z Zahnärztl Implantol* 1991 8: 170-177.
84. Keller JC, Young FA, Hansel B. Systemic effects of porous Ti implants. *Dent Mater J* 1985; 1: 41-42.
85. Dean DD, Schwartz Z, Liu Y, Blanchard CR, Agrawal CM, Mabrey JD, Sylvia V, Lohmann CH and Boyan BD. The effect of ultra-high molecular weight polyethylene wear debris on MG63 osteosarcoma cells in vitro. *J Bone and Joint Surg* 1999; 81-A: 452-461.
86. Allen MJ, Myer BJ, Millet PJ and Rushton N. The effects of particulate cobalt, cromium and cobalt-chromium alloy on human osteoblast-like cells in vitro. *J Bone and Joint Surg* 1997; 79-B(3):475-482.
87. Cabrini RL y Carranza FA (h). Estudio histoquímico de las sustancias PAS positivas metacromáticas y basófilas en los tejidos periodontales. *Rev Odont (Bs. As.)*1956; 44: 306-315.

88. Daum S, Anderson HA, Lilis R, Lorimer W, Fischbein SA, Miller A, Selikoff IJ. Pulmonary changes among titanium workers (abstract). *Proc Roy Soc Med* 1977; 70:31-32.
89. Ferin J and Oberdörster G. Biological effects and toxicity assessment of titanium dioxides: anatase and rutile. *Am Indust Hyg Assn J* 1985; 46: 69-72.
90. Garabrant DH, Fine LJ, Oliver C, Bernstein L, Peters JM. Abnormalities of Pulmonary Function and Pleural Disease among Titanium Metal Production Workers. *Scandinavian J Work Environ and Health* 1987; 13: 47-51.
91. Lee K, Henry NW, Trochimowicz HJ and Reinhardt CF. Pulmonary Response to Impaired Lung Clearance in Rats following Excessive TiO₂ Dust Deposition. *Environ Res* 1986; 41: 144-167.
92. Legget RW. The behaviour and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys* 1989; 57:365-383.
93. Albores-Saavedra j, Vuitch F, Delgado R, Wiley E, Hagler H. Sinus histiocytosis of pelvic lymph nodes after hip replacement. *Am J Surg Pathol* 1995; 18: 83-90.

94. Basté MF, Bertrand A, Guyetant S, Chappard D, Lesourd M. Migration of metal and polyethylene particles from articular prostheses may generate lymphadenopathy with histiocytosis. *J Biomed Mater Res* 1996; 30: 157-164.
95. Hallab N, Merrit K, Jacobs J. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. Current concepts review. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A ; 3: 428-436.
96. Gillespie WJ, Frampton CMA, Henderson RJ, Ryan PM. The incidence of cancer following total hip replacement. *J Bone Joint Surg (Br)* 1988; 70: 539-542.
97. Jacobs JJ, Urban RM, Wall J, Black J, Reid MD, Vereman L. Unusual foreign body reaction to a failed total knee replacement: Stimulation of a sarcoma clinically and sarcoid histologically. *J Bone Joint Surg (Am)* 1995; 77: 444-451.
98. Barckhaus RH, Schmidt PF, Roessner A, Timm C, Höhling JH, Grundmann E. Electroprobe x-ray microanalysis and laser microprobe mass analysis (LAMA) of titanium in tumor cells of a typical osteoblastic osteosarcoma. *Trace Elem Med* 1985; 2: 73-76.
99. Barckhaus RH, Schmidt PF, Höhling JH. Titanium and cancer growth? In: Collery P, Poirier LA, Manfait M, Etienne JC (eds). *Metal Ions in Biology and Medicine*. Paris: John Libbrey Eurotext, 1990: 284-288.

100. Dorr LD, Bloebaum R, Emmanual J, Meldrum R. Histological, biochemical and ion analysis of tissues and fluids retrieved during total hip arthroplasty. Clin Orthop 1990; 261: 82-95.
101. Merrit K, Brown SA y Sharkey NA. The binding of metal salts and corrosion products to cells and proteins in vitro. J Biomed Mater Res 1984; 18:1005-1015.
102. Brown SA, Merrit K, Farnsworth L and Crowe T. Biological significance of Metal Ion Release, in "Quantitative haracterizacion and Performance of Porous implants for Hard Tissue Applications" (American Society for Testing Materials" 1987, 163-181.
103. Alfrey AC. Physilogy of Aluminium in Man. In "Aluminium Health. Acritical Review"- HJ Gitelman- New York, 1989; 101-124.
104. Bianco P, Ducheyne P, Cuckler JM. Titanium serum and urine levels in rabbits with a titanium implant in absence of wear. Biomat 1996; 17:1937-1942.
105. Smith DC, Lugowsky S, McHugh A, Deporte D, Watson P, Chipman M. Systemic Metal Ion Levels in Dental Implant Patients. Int J Oral Maxillofac Implants 1997; 12: 828-834.

106. Yang J, Merrit K. Detection of antibodies against corrosion products in patients after Co-Cr total joint replacements. *J Biomed Mater Res* 1994; 28: 1249-1258.
107. Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, Goldberg MJ, Harris WH. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunochemical techniques and in situ hybridization. *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75(6): 863-879.
108. Goodman SB, Huie P, Song Y, Lee K, Doshi A, Rushdieh B, Woolson S, Maloney W, Schurman D, Sibley R. Loosening and osteolysis of cemented joint arthroplasties. A biologic spectrum. *Clin Orthop* 1977; 337: 149-163.
109. Elves MW, Wilson JN, Scales JT, Kemp HB. Incidence of metal sensitivity in patients with total joint replacements. *Br Med J* 1975; 4: 376-378.
110. Duffó G, Barreiro M, Olmedo D, Crosa M, Guglielmotti MB, Cabrini RL. An experimental model to study implant corrosion. *Acta Odont Latinoamer* 1999; 12 (1): 3-10.