



FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Análise do efeito de modificações químicas em superfícies de titânio e sua relação com o processo de osteogénese**

Trabalho final do 5º Ano com vista à atribuição do grau de mestre no âmbito do ciclo de estudos de Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Rainde Naiara Rezende de Jesus

2013

Trabalho realizado sob a orientação de:

Profª. Drª. Eunice Virgínia Palmeirão Carrilho

Prof. Dr. Darceny Zanetta-Barbosa



## **Análise do efeito de modificações químicas em superfícies de titânio e sua relação com o processo de osteogénese**

Rainde de Jesus<sup>(a)</sup>, Eunice Carrilho<sup>(b)</sup>, Darceny Zanetta-Barbosa<sup>(c)</sup>

- (a) Discente da Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal.
- (b) Professora Auxiliar com Agregação da Unidade de Dentisteria Operatória e Endodontia, Coordenadora da Unidade de Clínica Integrada e do Grupo de Dentisteria Operatória e Endodontia, e Membro da Comissão de Sub-Direcção da Faculdade de Medicina para a Área de Medicina Dentária, Universidade de Coimbra, Portugal.
- (c) Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

### **Endereço:**

Unidade de Dentisteria Operatória e Endodontia da Área de Medicina Dentária - Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra

Coimbra, Portugal

E-mail: [eunicecarrilho@gmail.com](mailto:eunicecarrilho@gmail.com)

## Resumo

Muitos estudos têm-se dedicado a melhorar os padrões do processo de resposta biológica com o objetivo de otimizar o reparo ósseo e favorecer o contato osso-implante. Modificações físicas e químicas nas superfícies dos implantes de titânio têm sido realizadas a fim de acelerar a velocidade de neoformação óssea por meio de uma modulação positiva das células osteogênicas. O presente estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar o efeito de dois tipos de superfície de titânio com alterações de rugosidade: lisa com duplo ataque ácido e duplo ataque ácido seguido da incorporação de biossilicato, um vidro bioativo, sobre parâmetros osteogênicos em cultura de células hFOB 1.19. As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> até atingirem confluência, libradas por tripsinização, contadas em hemocítomos e plaqueadas sobre os dois tipos de superfície na densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço e mantidas a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Para avaliar o efeito do tratamento de superfície na resposta celular, foi avaliada a viabilidade em 24 horas pelo método colorimétrico MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]) formazan, adesão em 4 horas pelo método de contagem pelo azul de tripan e atividade de fosfatase alcalina e proteína total em 24 horas. O fundo da placa de poliestireno foi utilizado como controlo. Os resultados foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. De acordo com os dados obtidos neste estudo não houve diferenças estatisticamente significantes entre as duas superfícies analisadas em cada um dos parâmetros avaliados, assim como entre essas e o grupo de controlo. Dessa forma, a modificação química da superfície do implante não interferiu na viabilidade e nem tão-pouco foi capaz de acelerar o processo de diferenciação celular por meio de um incremento na adesão e na atividade de fosfatase e proteína total, segundo dados obtidos com a linhagem hFOB 1.19, o que não descarta estudos envolvendo outras linhagens e diferentes tempos experimentais a fim de confirmar os presentes dados.

**Palavras-chave:** titânio; modificações químicas; osteogênese; osteoblastos; osseointegração

## 1. Introdução

O processo de desenvolvimento de implantes orais tem passado por diversas fases de investigação. O longo processo de pesquisa científica e clínica resultou na ampla aceitação da abordagem terapêutica com implantes endósseos no campo da Medicina Dentária<sup>[1-7]</sup>. Devido às suas elevadas taxas de sucesso relatadas em estudos longitudinais, com seguimento de mais de 5 anos superiores a 91% na maxila e de 94% na mandíbula<sup>[1-2,8-11]</sup>, revelando a previsibilidade da técnica na reabilitação de pacientes desdentados parciais e totais<sup>[12]</sup>. Sobretudo, sabe-se que as taxas de sucesso supracitadas variam consoante a área dos maxilares e mesmo acerca de aspetos sistémicos e individuais de cada paciente<sup>[3,13-14]</sup>.

Muitos estudos têm se dedicado a melhorar os padrões do processo de resposta biológica com o objetivo de otimizar o reparo ósseo e favorecer o contato osso-implante<sup>[15]</sup>. A partir da década de 1990, com os estudos relacionados à microtopografia <sup>[4-5]</sup>, iniciou-se uma nova era dos implantes dentários, as modificações de superfície, apresentando resultados promissores, acelerando a velocidade de osseointegração e regulando positivamente a resposta do tecido ósseo a fim de obter maior estabilidade do implante<sup>[16,6-7]</sup>.

A qualidade da superfície do implante é um dos seis fatores descritos por Albrektsson<sup>[17]</sup>, que influenciam a cicatrização tecidual no sítio do implante e, subsequentemente, afetam a osseointegração. Progressivamente, com a finalidade de melhorar a taxa de sucesso dos tratamentos, foi proposta uma série de alterações dos desenhos<sup>[18]</sup> e às superfícies dos implantes<sup>[19-23]</sup> para propiciar o desenvolvimento de sistemas de implantes com propriedades biológicas ideais para promover a absorção de proteínas, adesão e diferenciação celular, resultando em uma rápida integração tecidual.

A área da nanotecnologia pode desenvolver superfícies com diferentes composições químicas e modificações topográficas<sup>[24-28]</sup>, que contribuem para a compreensão das interações biológicas e desenvolvimento de sistemas de implantes favoráveis à rápida remodelação tecidual<sup>[21,29-31]</sup>.

Segundo Coelho<sup>[29]</sup>, atualmente, além das alterações físicas da superfície, a incorporação nanométrica de biocerâmicas aos implantes aponta novas possibilidades quanto à melhora no tempo de osseointegração, baseadas nas evidências do seu excelente comportamento biológico. O biossilicato é uma cerâmica de vidro bioativo. Seus efeitos positivos baseiam-se na dissolução iónica de seus componentes, sendo capaz de atuar sobre células osteogénicas, ativando genes relacionados com a diferenciação celular e indução do processo de mineralização<sup>[32-33]</sup>.

Até ao momento, a absorção de proteínas<sup>[34-35]</sup>, adesão celular<sup>[36]</sup> e diferenciação de determinadas linhagens celulares<sup>[37]</sup> devem ser estudadas como parâmetros osteogénicos em relação às propriedades de superfície<sup>[38-41]</sup>. Esta abordagem deve definir uma superfície

bioativa para uma resposta biológica específica, sendo que os processamentos industriais se encontram em franco desenvolvimento e estudos preliminares contribuirão para melhorar ou ratificar quais procedimentos conduzem à uma melhor compreensão da osseointegração do ponto de vista biológico e mecânico.

Baseado nas características do bioossilicato, o grupo de pesquisa de engenharia de materiais da Universidade Federal de São Carlos (Brasil), iniciou pesquisas buscando incorporar esse material ao titânio. Diante disso, em parceria, propomos avaliar em cultura de osteoblastos imortalizados da linhagem hFOB 1.19 a influência dessa cobertura sobre os parâmetros de neo-osteogênese como adesão, viabilidade e diferenciação celular a partir da expressão gênica de importantes proteínas da matriz, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e conteúdo de proteína total sobre dois tipos de superfície de titânio com alterações de rugosidade a partir de duplo ataque ácido (Tratada) e com duplo ataque ácido seguido de incorporação de bioossilicato (Tratada+Bio).

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Obtenção e Caracterização das superfícies de titânio**

Discos de titânio comercialmente puro (ASTM F67-G4) de 8,0 mm de diâmetro por 4,0 de altura foram fabricados para esta pesquisa pelo Laboratório de Materiais Vítrios da Faculdade de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP, Brasil). Os espécimes (n=18 discos/grupo) receberam dois tipos de tratamento de superfície: duplo ataque ácido (S1) e duplo ataque ácido seguido da incorporação de um vidro altamente bioativo (HCG) (S2) (Figura 1). Os discos tratados com ácido foram imersos em uma mistura contendo ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), clorídrico (HCl) e sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). A liga do HCG utilizada foi a partir do sistema  $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$ . Nesse caso, foram preparados dois grupos do titânio comercialmente puro. Um grupo foi tratado com um método próprio utilizando o pó de partículas de HBG com diâmetro médio de  $49\mu\text{m}$  e o outro permaneceu não tratado. Ambas as superfícies apresentaram a mesma rugosidade inicial ( $R_a = 0,4 \text{ mM}$  e  $\text{SDR} = 2\%$ ).



Figura 1: Discos de titânio com diferentes tratamentos de superfície: (A) Tratada e (B) Tratada-Bio.

O teste de bioatividade das superfícies basearam-se no ISO 23.317 (2007) - “*Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials*”, nos tempos experimentais de 2, 4, 8, 24, 120 e 240 horas, revelando que o tratamento da superfície de titânio com o vidro bioativo melhora significativamente a sua capacidade para ativação da resposta biológica.

A rugosidade, molhabilidade e morfologia das superfícies foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho pós-transformada de Fourier (FTIR), lupa estereoscópica, microscopia de força atômica (AFM) e um medidor de ângulo de contato. A rugosidade foi determinada pelo valor Ra (média aritmética da altura dos picos) e a molhabilidade pela mensuração do ângulo de contato entre água destilada e as superfícies dos discos<sup>[42]</sup>.

## 2.2 Cultura de células

Células da linhagem osteoblástica hFOB 1.19 (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) foram selecionadas para esta investigação por expressarem marcadores fenotípicos de osteoblásticos e mineralizarem sua matriz extracelular<sup>[43-44]</sup>. As células foram descongeladas, cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> contendo uma mistura de 1:1 de meio Eagle modificado por Dulbecco (alta glicose) e Hams F12 (DMEN/F12) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementada com 10% de soro fetal bovino (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina/streptomicona/anfotericina) (Invitrogen). As culturas foram mantidas numa estufa humidificadora a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar até atingirem confluência.

As células foram isoladas por digestão enzimática com solução de tripsina e EDTA por 5 minutos a 37 °C. Após estarem desprendidas do fundo da placa, as células foram coletadas e a ação proteolítica da tripsina foi inibida pela ação de soro fetal bovino à suspensão. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 1200rpm, a 22 °C e o “pellet” obtido foi ressuspenso em DMEM/F12. As células foram contadas em hemocítomos e plaqueadas a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/poço sobre os discos de titânio em placas de poliestireno (controle) de 24 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). Cada poço foi completado com 1 mL de DMEM a 10% completo (acrescido de ácido ascórbico 50 µg/ml, βglicerofosfato 10 µmol e dexametasona 10 nmol), sendo que a cada três dias o mesmo era trocado e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase.

Os osteoblastos foram mantidos em cultura durante 14 dias após o plaqueamento, sendo que nos períodos de 4, 24 horas e 14 dias, os sobrenadantes foram coletados para determinação da adesão celular para avaliação da viabilidade dos osteoblastos, bem como e quantificação de fosfatase alcalina (ALP) e proteína total.

### **2.3 Análise da adesão celular**

A adesão celular foi determinada por contagem do número total de núcleos de células aderidas aos discos de titânio em 4 horas. Após o tempo especificado, o sobrenadante foi coletado, as células sobre os discos foram fixadas em paraformaldeído 4%, lavadas, permeabilizadas em triton x-100, incubadas em 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Molecular Probes) durante cinco minutos para marcação do DNA nuclear e montadas em meio anti-fade. A captura das imagens dos núcleos das células aderidas foi feita com um microscópio de fluorescência direta usando comprimento de onda UV. A contagem foi feita posteriormente, por área e campo analisados em triplicata (objetivas de 40X).

### **2.4 Análise da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi determinada por meio do método colorimétrico MTT formazan. Este método é baseado na clivagem redutora de MTT (um sal amarelo) para formazan (um composto azul escuro) por enzimas mitocondriais presentes em células vivas. Brevemente, de cada poço, 600 µL de meio de cultura foram aspirados e armazenados a -70 °C até à utilização, restando 400 µL. A atividade enzimática foi determinada adicionando 40 µL/poço de MTT (2128, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), na concentração de 5mg/ml,



seguida de incubação das placas a 37 °C por 4 horas. Após o período de incubação, os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos com 400 µL/poço de dimetil sulfóxido (DMSO, Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Em seguida, o conteúdo de cada poço foi homogeneizado utilizando um micropipetador e uma alíquota de 100 µL de cada um foi transferida para poços separados em uma placa de 96 poços (Corning Incorporated).

A absorvância foi determinada num leitor de microplacas (Instrutherm Espectrofotômetro UV-2000A, São Paulo, SP, Brasil) a 570 nm. A densidade ótica de cada poço foi proporcional à quantidade de cor. Os testes foram realizados em triplicata.

## **2.5 Conteúdo de proteína total**

O conteúdo de proteína total após 24 horas em cultura, foi determinado de acordo com o método de Lowry modificado<sup>[45]</sup>. Inicialmente, foram extraídas proteínas de cada poço com lauril sulfato de sódio a 1% (Sigma) durante 30 minutos e misturado na proporção de 1:1 com solução de Lowry (Sigma) durante 20 minutos em temperatura ambiente. Esta reação permitiu o desenvolvimento de cor e a medida da absorvância foi feita através de espectrofotômetro (Cecil CE3021, Cambridge, Reino Unido) no comprimento de onda de 680 nm. O conteúdo de proteína total (µg/mL) foi calculado a partir uma curva padrão e os dados obtidos foram normalizados pelo número de células contadas.

## **2.6 Atividade de fosfatase alcalina**

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi avaliada em alíquota de mesma solução usada na determinação do conteúdo de proteína total, pela liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial (Labtest Diagnostica, MG, Brasil). Primeiramente, 50 µL de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1 e mantidos por 2 minutos a 37 °C. Juntou-se a solução a uma alíquota de 50 µL obtida de cada poço por 10 minutos a 37 °C. Para a coloração, 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 0,09 M e NaOH a 0,25 M foram adicionados. Após 30 minutos, a absorvância foi medida a 590 nm e a atividade de ALP, calculada com uma curva padrão usando timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 µmol de timolftaleína/h/mL. Os resultados foram expressos como atividade de ALP normalizada pelo conteúdo de proteína total.

## **2.7 Análise estatística**

A estatística descritiva foi calculada através do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Prism version 5.0 for Windows, San Diego, CA, USA). Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade de variâncias (Levene). Os parâmetros analisados foram comparados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Tukey quando necessário. Os níveis de conteúdo de proteína total e ALP também foram testados por meio do mesmo teste. Para todas as análises estatísticas, o nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 Adesão celular

O ensaio de adesão celular revelou não haver diferenças significantes entre as superfícies em 4 horas (Figura 2).

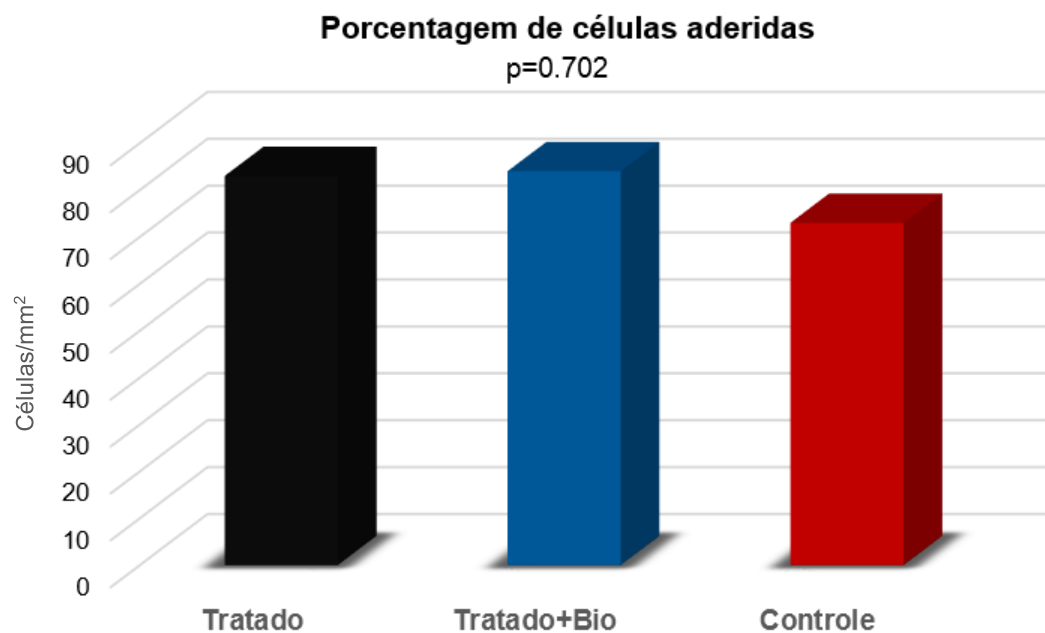


Figura 2: Adesão das células hFOB 1.19 (número de células/mm<sup>2</sup>) sobre superfície com duplo ataque ácido, duplo ataque ácido seguido de incorporação de biossilicato e controle, em 4 horas. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as superfícies (teste de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ).

### 3.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi estatisticamente semelhante em todas as superfícies de Ti em 24 horas ( $p > 0,05$ ) (Figura 3).

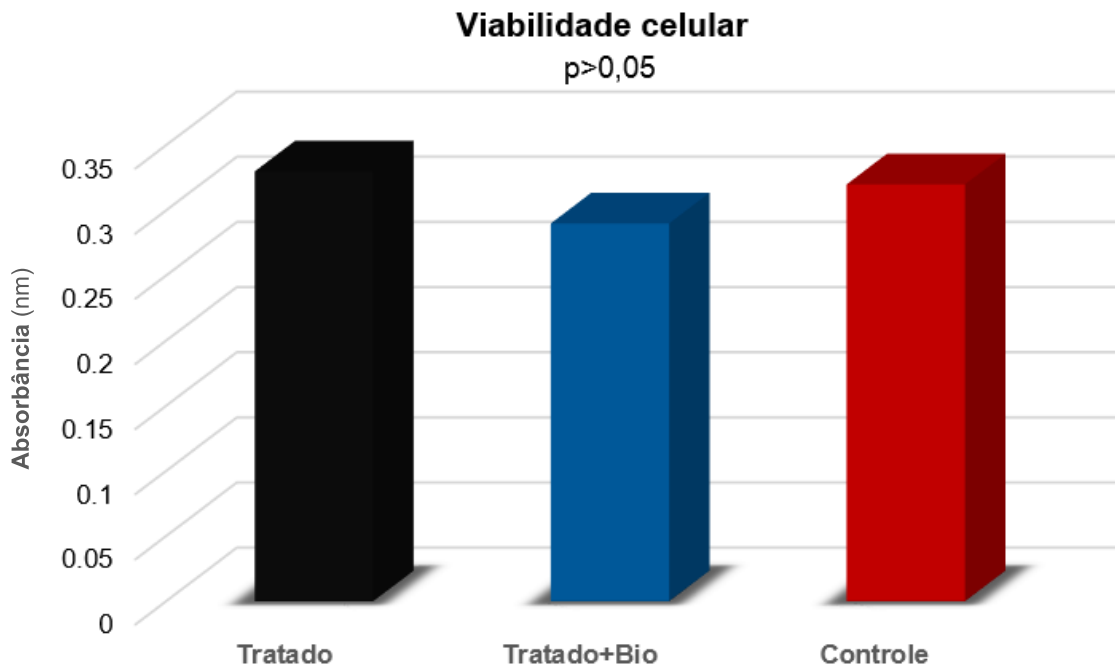


Figura 3: Viabilidade das células hFOB 1.19 (absorbância em nm) sobre as superfícies com duplo ataque ácido, duplo ataque ácido seguido de incorporação de biossilicato e controle, após 24 horas de cultura. Não houveram diferenças estatisticamente significantes entre as superfícies (teste de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ).

### 3.3 Atividade de fosfatase alcalina

Embora os valores médios de fosfatase tenham sido ligeiramente maiores no grupo com duplo ataque ácido seguido de incorporação com biossilicato, essa diferença quantitativa não representa valor estatístico. Portanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tipos de tratamento de superfície do titânio quando comparadas ao grupo de controle e entre si.

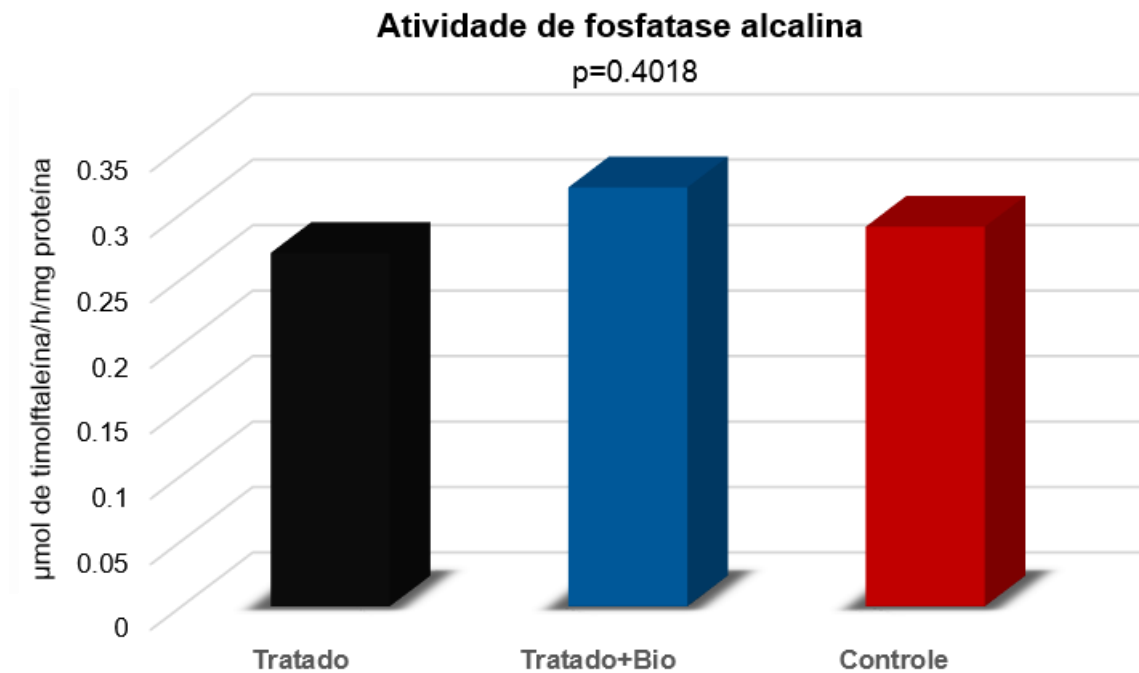


Figura 4: Atividade de fosfatase alcalina das células hFOB 1.19 ( $\mu\text{mol}$  de timolftaleína/h/mg proteína) sobre a superfície com duplo ataque ácido, duplo ataque ácido seguido de incorporação de bioossilicato e controle, após 24 horas de cultura. Não houveram diferenças estatisticamente significantes entre as superfícies (Teste de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ).

### 3.4 Conteúdo de proteína total

Relativamente à quantidade de proteína total, foram encontradas diferenças significativas no grupo tratado apenas com ataque ácido, quando comparado ao grupo tratado com ataque ácido seguido de incorporação com bioossilicato, e também ao grupo de controle. No entanto, é importante salientar que o total de proteína detectado não necessariamente reflete uma modulação nos parâmetros osteogénicos de interesse do presente trabalho.

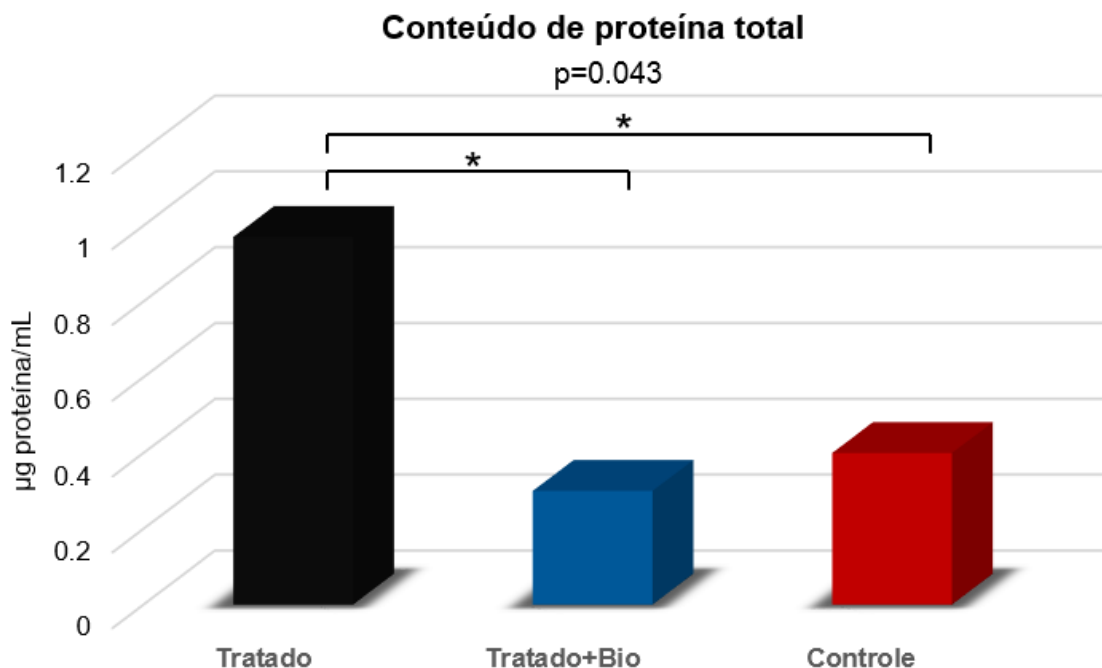


Figura 5: Conteúdo de proteína total ( $\mu\text{g/mL}$ ) de culturas osteogénicas hFOB 1.19, detectada sobre superfície com duplo ataque ácido, duplo ataque ácido seguido de incorporação com biossilicato e controlo, em 24 horas. A ordem da proteína total foi Tratado>Tratado+Bio>Controle (teste de Kruskal-Wallis,  $p<0,05$ ).

#### 4. Discussão

Os resultados do presente estudo mostraram que a microestrutura de superfícies de titânio pode afetar importantes parâmetros da osteogénese *in vitro* no modelo de cultura de células osteogénicas hFOB 1.19. De acordo com os últimos estudos publicados, o processo de osseointegração é dependente de alguns fatores que vão influenciá-lo diretamente, tais como a biocompatibilidade do material, o desenho do implante, as características da superfície do implante, o estado do leito recetor, a técnica cirúrgica utilizada, condições de carga aplicadas sobre o implante após a sua instalação e consequente estabilização inicial dos mesmos<sup>[17,46,8]</sup>.

Uma constatação dominante em numerosos estudos é o facto de que as superfícies de implantes de Ti com uma rugosidade específica e características microestruturais<sup>[47-48]</sup> podem promover melhorias no processo de integração óssea<sup>[49-50,6-7,15,51-53]</sup>, fundamentalmente nas interações das superfícies com proteínas e células<sup>[6]</sup>. Diversos têm sido os métodos aplicados durante as últimas 2 décadas para modificação da textura e composição química das superfícies de implantes dentários<sup>[47]</sup>, com o objetivo de otimizar a

resposta óssea, acelerando o processo de osseointegração e melhorando quantitativamente e qualitativamente o contato osso-implante<sup>[54,30]</sup>. Jateamento, anodização, ataque ácido, tratamento químico e implantação iônica foram os métodos mais frequentemente usados até ao momento para modificar a rugosidade da superfície dos implantes dentários<sup>[55,48,56-58,25,59,18,26,60]</sup>. O aumento da rugosidade em microescala procura mimetizar as características da superfície com características de tamanho comparáveis à do tecido ósseo, como as regiões de depressão resultantes da reabsorção osteoclástica e as próprias dimensões celulares<sup>[61-62]</sup>.

De acordo com a literatura, o papel preciso da topografia e composição química das superfícies na resposta aos eventos iniciais da osseointegração ainda não está bem compreendido. O ataque ácido com ácidos fortes como, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>2</sub> e HF é um dos diversos métodos de subtração para obter uma alteração de rugosidade do titânio. Esse tratamento produz microestruturas nas superfícies com tamanhos variados de 0,5 a 2 µm de diâmetro<sup>[21]</sup> e tem sido demonstrado que uma superfície com rugosidade moderada demonstra ter maiores vantagens clínicas diante daquelas mais suaves e com superfícies mais ásperas, apesar das diferenças quantitativas não serem estatisticamente significantes<sup>[6,47,61]</sup>.

Em busca do aprimoramento dos parâmetros da resposta óssea, indústrias e pesquisadores têm-se empenhado em desenvolver, cada vez mais, superfícies de titânio bioativas<sup>[63-64,29-30]</sup>. Pode-se definir superfícies de titânio bioativas como aquelas que além de apresentarem modificações quanto a rugosidade superficial também possuem incorporação de substâncias potencialmente capazes de influenciar a diferenciação das células osteogênicas, aumentando a velocidade de deposição óssea e a qualidade da mesma, influenciando a longevidade da terapêutica aplicada<sup>[65-66]</sup>. Essas superfícies podem ser compostas por Ca e P, DNA, moléculas imobilizadas como proteínas e fatores de crescimento <sup>[67-68]</sup>.

Durante a última década, têm sido desenvolvidas superfícies com incorporação de agentes bioquímicos e moleculares como Ca e P, DNA, proteínas e fatores de crescimento <sup>[6,67-68]</sup>. Adicionalmente, a incorporação nanométrica de biocerâmicas aos implantes aponta novas possibilidades quanto à melhoria no tempo de osseointegração<sup>[69,66,70-75]</sup>. Uma das estratégias para melhorar o desempenho mecânico dos vidros bioativos para incorporação em implantes dentários<sup>[76]</sup> e outras aplicações a nível clínico<sup>[77]</sup> tem sido o desenvolvimento de uma cerâmica de vidro com propriedades bioestimuladoras, o Biossilicato. Diante disso, o presente estudo avaliou a influência de duas superfícies de implante com alteração de rugosidade e modificação química sobre a resposta de osteoblastos humanos imortalizados.

Os resultados obtidos demonstraram que o processo de osteogênese *in vitro* é influenciado pela interação célula-superfície. Entretanto, a hipótese proposta foi rejeitada.

O perfil de adesão celular sobre as duas superfícies tratadas revelou o mesmo padrão comportamental em 4 horas, não revelando diferenças estatisticamente significantes entre si, mesmo que os valores tenham sido quantitativamente superiores em relação ao grupo de controle.

A viabilidade celular sugere que houve um aumento na taxa de proliferação celular dentro do período de 24 horas em cultura para a superfície com duplo ataque ácido, comparativamente às outras. Diante desse parâmetro, nota-se que o estímulo da superfície com incorporação de biossilicato não superou o comportamento do grupo de controle em questão. Estudos comparativos num período de 7 a 14 dias revelam que, entre esse período, as células atingem a sua confluência máxima, resultando na paragem da proliferação para o início da diferenciação<sup>[34,37]</sup>. De acordo com Boyan<sup>[16]</sup>, células cultivadas em superfícies rugosas tendem a exibir características mais diferenciadas, com conseqüente redução da proliferação celular. Logo, se o tempo experimental de 5 dias fosse incluído na nossa metodologia, seriam mais evidentes as diferenças nas taxas de proliferação celular entre as superfícies com modificação topográfica e química.

Apesar da enorme disponibilidade de trabalhos na literatura atual caracterizando as modificações físico-químicas das superfícies dos implantes, o padrão do comportamento biológico, incluindo a cascata de eventos celulares e moleculares desencadeados por estas, ainda não estão suficientemente esclarecidos<sup>[78,27]</sup>. A maioria das pesquisas desenvolvidas estão relacionadas com eventos iniciais, como a adesão celular<sup>[79]</sup>, morfologia<sup>[80]</sup> e proliferação celular<sup>[81,62]</sup>, em curtos períodos de tempo.

Os principais mecanismos relacionados ao processo de osseointegração referem-se à atividade de remodelação óssea, resposta da linhagem osteogénica que ocorre no feto durante as fases de desenvolvimento. O passo inicial no processo de cicatrização do osso inicia-se com a migração das células osteogénicas, derivadas a partir da camada do osso medular, incluindo células mesenquimatosas indiferenciadas, osteócitos e osteoblastos, diretamente para um quadro suportado pelo coágulo sanguíneo. Vários eventos ocorrem simultaneamente durante o preparo do sítio recetor e instalação cirúrgica de um implante no tecido ósseo<sup>[82,27]</sup>. Segundo Lavenus<sup>[30]</sup>, o maior desafio da pesquisa básica na Implantodontia é a capacidade da superfície em guiar a diferenciação celular, apesar da adesão e proliferação das células sobre as superfícies dos implantes serem pré-requisitos para o início da regeneração óssea.

A capacidade que a superfície do implante tem para reter esta fibrina durante o processo de contração da matriz é de fundamental importância, e determina se a migração das células irá ou não atingir a superfície<sup>[27,83]</sup>. No entanto, devemos considerar que no modelo experimental *in vitro* não existe a possibilidade de formação da rede de fibrina.

No momento em que as células osteogênicas atingem a superfície do implante, elas diferenciam-se em osteoblastos ativos com a polarização dos núcleos e secreção de matriz óssea por aposição. O estágio inicial da formação óssea consiste na secreção da matriz orgânica cementária sem colágeno, que possui sítios de nucleação para induzir a mineralização por íons cálcio e fosfato. São identificadas nessa matriz proteínas não colágenas, como fosfatase alcalina, osteopontina, sialoproteína e proteoglicanas <sup>[84,27,56]</sup>. Vários estudos *in vitro* mostraram que a rugosidade superficial do titânio diminui a proliferação de células semelhantes a osteoblastos e aumenta a diferenciação celular através do aumento da atividade de fosfatase alcalina, da síntese de proteínas, da produção de osteocalcina e da formação de nódulos de calcificação.

A fosfatase alcalina é considerada um marcador inicial do processo de mineralização e da diferenciação das células osteogênicas em fenótipo de osteoblasto<sup>[27,85]</sup>. Desse modo, apesar de não ter sido identificada alguma diferença estatisticamente significativa entre os valores da atividade de fosfatase alcalina, nota-se que a superfície com duplo ataque ácido seguido de incorporação por biossilicato apresenta uma maior taxa de produção da proteína colágena, em detrimento aos demais grupos. O estudo de Park<sup>[85]</sup>, realizado nos períodos de 7 a 14 dias, revela que a modificação química da superfície favorece a diferenciação de pré-osteoblastos. Já em relação à quantidade de proteína total, foram encontradas diferenças significativas no grupo tratado apenas com ataque ácido, quando comparado ao grupo tratado com ataque ácido seguido de incorporação com biossilicato, e também ao controle. No entanto, é importante salientar que o total de proteína detectado não reflete necessariamente uma modulação positiva nos parâmetros osteogênicos de interesse.

O processo conhecido como osteogênese de contacto, é desenvolvido pelo mecanismo de ação dos biomateriais conhecido como osteocondução (recrutamento e migração) das células osteogênicas até à superfície. Nesse caso, a neoformação óssea ocorre a partir da superfície do implante em direção centrífuga à superfície óssea peri-implantar pré-existente. Todavia, este não é o único processo responsável pela deposição óssea ao redor dos implantes. Na osteogênese à distância, o novo tecido ósseo é formado a partir da superfície do osso pré-existente e não da superfície do implante<sup>[27]</sup>. Seguindo este raciocínio, a predominância de um ou de outro processo depende do tratamento superficial, revelando-se um dos maiores desafios da Ciência de Materiais.



Num estudo de 2002<sup>[86]</sup>, foi demonstrado que tratamentos químicos podem reduzir as propriedades mecânicas do titânio. Por exemplo, o ácido adicionado à solução para tratamento da superfície pode levar à fragilização do titânio por produzir micro-fissuras na sua superfície que podem reduzir a resistência à sobrecarga dos implantes. Além disso, os dados sugerem que os processos industriais podem afetar o comportamento dos osteoblastos à volta dos implantes de titânio e devem ser cuidadosamente monitorizados por bioensaios. Os benefícios de superfícies bioativas dependem da estabilidade e taxa de dissolução da cobertura incorporada ao titânio<sup>[29]</sup>, e a determinação das taxas de degradação/dissolução são difíceis de se prever num estado *in vitro*.

Provavelmente, a ausência de parâmetros como dissolução, forma do cristal e composição da fase, para superfícies apenas modificadas fisicamente, faz com que limitem a capacidade de uma avaliação mais íntegra, em estágios mais avançados da resposta celular. Portanto, os resultados apresentados são suportados por Le Guéhennec<sup>[21]</sup> que concluíram, na sua revisão de tratamento de superfície, que a rugosidade de superfície melhora o padrão da osseointegração, mas que a função exata da topografia e composição nos eventos iniciais da osteogénese ainda se encontra muito pouco entendida. Torna-se essencial que as superfícies com modificações químicas que se encontram em amplo desenvolvimento, continuem a ser avaliadas com elevado grau de tecnologia para validação da sua aplicação clínica. Assim, mais estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando co-cultura de osteoblastos, osteoclastos e células mononucleares, em variados tempos experimentais, deveriam ser realizados, a fim de que se investiguem a secreção de citocinas, expressão génica e outros fatores de transcrição envolvidos no processo do reparo tecidual.

## 5. Conclusões

De acordo com os objetivos propostos e a metodologia empregada neste estudo, pode-se concluir que a modificação química da superfície do implante não interferiu na viabilidade e nem foi sequer capaz de acelerar o processo de diferenciação celular por meio de um incremento na adesão e na atividade de fosfatase, segundo dados obtidos com a linhagem hFOB 1.19, o que não descarta estudos envolvendo outras linhagens e diferentes tempos experimentais a fim de confirmar os presentes achados.

Os resultados apresentados suportam as observações que a rugosidade pode ter um maior desempenho funcional na determinação da resposta biológica do que a composição da superfície. Estudos clínicos comparativos com diferentes superfícies de implantes são raramente realizados. O futuro da implantodontia deve tornar objetivo o desenvolvimento de superfícies com topografia e composição química padronizadas e controladas. Essa

abordagem será o único caminho pelo qual as interações entre as proteínas, células, tecidos e superfícies dos implantes serão esclarecidos.

Para tanto, o controlo das modificações de superfícies em relação ao nível de potencial de estímulo, em uma escala micro e nanométrica, requer uma mudança de postura dos investigadores frente aos fabricantes de implantes e à atuação das empresas no atual mercado competitivo e sob a influência do surgimento de novas e melhores tecnologias.

## **6. Agradecimentos**

À Prof. Dra. Eunice Virgínia Palmeirão Carrilho, pelo apoio na categoria de discente durante a realização do intercâmbio de Graduação-Sanduiche na Área de Medicina Dentária da Universidade de Coimbra, por viabilizar os meios necessários à implementação do meu processo juntamente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e por estar sempre disponível para me auxiliar no que fosse necessário.

Ao Prof. Dr. Darceny Zanetta-Barbosa, pelo exemplo supremo de discente, orientador, pesquisador e cirurgião, por guiar os meus passos académicos desde o princípio da minha graduação e por favorecer o meu crescimento profissional e pessoal. E ainda por buscar incessantemente recursos financeiros e apoios interinstitucionais, nacionais e internacionais, possibilitando a realização das investigações de forma ética, científica e didática.

À Prof. Dra. Camilla Christian Gomes Moura, por ser a mentora do treinamento para aplicações experimentais no Laboratório de Cultura Celular e Biomateriais, e por nos guiar diante das dificuldades, suprindo-as com os seus conselhos e próprios exemplos, sempre em busca do benefício do aluno em prol do desenvolvimento científico e produção de conhecimento de qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, pela disponibilidade de recursos físicos à realização dos experimentos com cultura celular e por sempre incentivar o progresso da Ciência.

## **7. Bibliografia**

1. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. Scand J Plast Reconstr Surg. 1969;3(2):81-100.

2. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1977;16:1-132.
3. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI, A fifteen year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981; 10:387-416.
4. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. Design and surface characteristics of 13 commercially available oral implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1993;8(6):622-33.
5. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B, Krol JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res.* 1995 Mar;6(1):24-30.
6. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1- review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004 Sep-Oct;17(5):536-43.
7. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981;52(2):155-70.
8. Adell R, Hansson BO, Brånemark PI, Breine U. Intra-osseous anchorage of dental prostheses.II. Review of clinical approaches. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1970;4(1):19-34.
9. Ferrigno N, Laureti M, Fanali S, Grippaudo G. A long-term follow-up study of non-submerged ITI implants in the treatment of totally edentulous jaws. Part I: Ten-year life table analysis of a prospective multicenter study with 1286 implants. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Jun;13(3):260-73.
10. Weber HP, Crohin CC, Fiorellini JP. A 5-year prospective clinical and radiographic study of non-submerged dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2000 Apr;11(2):144-53.
11. Barewal RM, Stanford C, Weesner TC. A randomized controlled clinical trial comparing the effects of three loading protocols on dental implant stability. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2012 Jul-Aug;27(4):945-56.
12. Chiapasco M. Early and immediate restoration and loading of implants in completely edentulous patients. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19 Suppl:76-91.
13. Schnitman PA, Rubenstein JE, Whörle PS, DaSilva JD, Koch GG. Implants for partial edentulism. *J Dent Educ.* 1988 Dec;52(12):725-36.
14. Lemons J, Dietch-Misch F. Biomaterials for dental implants. In: Misch Ce, ed. *Contemporary Implant Dentistry.* St. Louis: Mosby 1999: 271-302.

15. Mendonça G, Mendonça DB, Simões LG, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, Cooper LF, Aragão FJ. Nanostructured alumina-coated implant surface: effect on osteoblast-related gene expression and bone-to-implant contact in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(2):205-15.
16. Boyan BD, Bonewald LF, Paschalis EP, Lohmann CH, Rosser J, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z, Boskey AL. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcif Tissue Int*. 2002 Dec;71(6):519-29.
17. Albrektsson T, Linder L. A method for short- and long-term in vivo study of the bone-implant interface. *Clin Orthop Relat Res*. 1981 Sep;(159):269-73.
18. Aljateeli M, Wang HL. Implant microdesigns and their impact on osseointegration. *Implant Dent*. 2013 Apr;22(2):127-32.
19. Citeau A, Guicheux J, Vinatier C, Layrolle P, Nguyen TP, Pilet P, Daculsi G. In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting. *Biomaterials*. 2005 Jan;26(2):157-65.
20. Geesink RG, Hoefnagels NH. Six-year results of hydroxyapatite-coated total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br*. 1995 Jul;77(4):534-47.
21. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007 Jul;23(7):844-54.
22. Lopez-Heredia MA, Weiss P, Layrolle P. An electrodeposition method of calcium phosphate coatings on titanium alloy. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 Feb;18(2):381-90.
23. Pezeshki P, Lugowski S, Davies JE. Dissolution behavior of calcium phosphate nanocrystals deposited on titanium alloy surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Aug;94(2):660-6.
24. Zhang YM, Bataillon-Linez P, Huang P, Zhao YM, Han Y, Traisnel M, Xu KW, Hildebrand HF. Surface analyses of micro-arc oxidized and hydrothermally treated titanium and effect on osteoblast behavior. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Feb 1;68(2):383-91.
25. Tomisa AP, Launey ME, Lee JS, Mankani MH, Wegst UG, Saiz E. Nanotechnology approaches to improve dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26 Suppl:25-44; discussion 45-9.
26. Bressan E, Sbricoli L, Guazzo R, Tocco I, Roman M, Vindigni V, Stellini E, Gardin C, Ferroni L, Sivoletta S, Zavan B. Nanostructured surfaces of dental implants. *Int J Mol Sci*. 2013 Jan 17;14(1):1918-31.
27. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003; 67: 932–949.
28. Wennerberg A, Svanborg LM, Berner S, Andersson M. Spontaneously formed nanostructures on titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Feb;24(2):203-9.

29. Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G, Thompson VP, Lemons JE. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Feb;88(2):579-96.
30. Lavenus S, Louarn G, Layrolle P. Nanotechnology and dental implants. *Int J Biomater*. 2010;2010:915327.
31. Sharma S, Cross SE, Hsueh C, Wali RP, Stieg AZ, Gimzewski JK. Nanocharacterization in dentistry. *Int J Mol Sci*. 2010 Jun 17;11(6):2523-45.
32. Bassi AP, Carvalho PS. Repair of bone cavities in dog's mandible filled with inorganic bovine bone and bioactive glass associated with platelet rich plasma. *Braz Dent J*. 2011;22(1):14-20.
33. Mrakovcic L, Wildburger R, Jaganjac M, Cindric M, Cipak A, Borovic-Sunjic S, Waeg G, Milankovic AM, Zarkovic N. Lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal as factor of oxidative homeostasis supporting bone regeneration with bioactive glasses. *Acta Biochim Pol*. 2010;57(2):173-8.
34. de Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem*. 2003 May;51(5):633-41.
35. Svendsen IE, Santos O, Sotres J, Wennerberg A, Breeding K, Arnebrant T, Lindh L. Adsorption of HSA, IgG and laminin-1 on model hydroxyapatite surfaces--effects of surface characteristics. *Biofouling*. 2012;28(1):87-97.
36. da Silva JS, Amico SC, Rodrigues AO, Barboza CA, Alves C Jr, Croci AT. Osteoblastlike cell adhesion on titanium surfaces modified by plasma nitriding. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 Mar-Apr;26(2):237-44.
37. Klinger A, Tadir A, Halabi A, Shapira L. The effect of surface processing of titanium implants on the behavior of human osteoblast-like Saos-2 cells. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011 Mar;13(1):64-70.
38. Villarreal DR, Sogal A, Ong JL. Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces *J Oral Implantol*. 1998;24(2):67-73.
39. Le Guehennec L, Lopez-Heredia MA, Enkel B, Weiss P, Amouriq Y, Layrolle P. Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. *Acta Biomater*. 2008 May;4(3):535-43.
40. Conserva E, Lanuti A, Menini M. Cell behavior related to implant surfaces with different microstructure and chemical composition: an in vitro analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010 Nov-Dec;25(6):1099-107.

41. Lavenus S, Ricquier JC, Louarn G, Layrolle P. Cell interaction with nanopatterned surface of implants. *Nonomedicine (Lond)*. 2010 Aug;5(6):937-47.
42. Elias CN. Titanium dental implant surfaces. *Rev Matéria* 2010; 15(2):140-44.
43. Liu X, Lim JY, Donahue HJ, Dhurjati R, Mastro AM, Vogler EA. Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro. *Biomaterials*. 2007 Nov;28(31):4535-50.
44. Setzer B, Bachle M, Metzger MC, Kohal RJ. The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia. *Biomaterials*. 2009;30(6):979-90.
45. Xavier SP, Carvalho PS, Beloti MM, Rosa AL. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. *J Dent*. 2003 Mar;31(3):173-80.
46. Brånemark PI, Engstrand P, Öhrnell LO, Gröndahl K, Nilsson P, Hagberg K, Darle C, Lekholm U. Brånemark Novum: a new treatment concept for rehabilitation of the edentulous mandible. Preliminary results from a prospective clinical follow-up study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 1999;1(1):2-16.
47. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol*. 2010 Apr;28(4):198-206.
48. Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010 Jan-Feb;25(1):63-74.
49. Buser D, Weber HP, Lang NP. Tissue integration of nonsubmerged implants. 1-year results of a prospective study with 100 ITI hollow-cylinder and hollow-screw implants. *Clin Oral Implants Res* 1990; 1:33-40.
50. Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent*. 2000 Nov;84(5):522-34.
51. Cochran DL, Jackson JM, Bernard JP, ten Bruggenkate CM, Buser D, Taylor TD, Weingart D, Schoolfield JD, Jones AA, Oates TW Jr. A 5 year prospective multicenter study of early loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011 Nov-Dec;26(6):1324-32.
52. Coelho PG, Bonfante EA, Pessoa RS, Marin C, Granato R, Giro G, Witek L, Suzuki M. Characterization of five different implant surfaces and their effect on osseointegration: a study in dogs. *J Periodontol* 2011 May;82(5):742-50.
53. Coelho PG, Granato R, Marin C, Jimbo R, Lin S, Witek L, Suzuki M, Bonfante EA. Effect of Si addition on Ca- and P impregnated implant surfaces with nanometer-scale

- roughness: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Mar;23(3):373-8.
54. Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;7(4):329-45.
55. Wennerberg A, Albrektsson T, Lindhe J. Surface topography of titanium implants. In: *Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral.* 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. P.821-25.
56. Berglundh T, Abrahamsson I, Albouy JP, Lindhe J. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Apr;18(2):147-52.
57. Bose S, Roy M, Das K, Bandyopadhyay A. Surface modification of titanium for load-bearing applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2009 Dec;20 Suppl 1:S19-24.
58. Cho YJ, Heo SJ, Koak JY, Kim SK, Lee SJ, Lee JH. Promotion of osseointegration of anodized titanium implants with a 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> submicron particle coating. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011 Nov-Dec;26(6):1225-32.
59. Förster Y, Rentsch C, Schneiders W, Bernhardt R, Simon JC, Worch H, Rammelt S. Surface modification of implants in long bone. *Biomater.* 2012 Jul 1;23(3):149-57.
60. Srinivasan M, Vazquez L, Rieder P, Moraguez O, Bernard JP, Belser UC. Survival rates of short (6 mm) micro-rough surface implants: a review of literature and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Feb 18.
61. Rosa MB, Albrektsson T, Francischone CE, Schwartz Filho HO, Wennerberg A. The influence of surface treatment on the implant roughness pattern. *J Appl Oral Sci.* 2012 Sep-Oct;20(5):550-5.
62. Kim MH, Lee SY, Kim MJ, Kim SK, Heo SJ, Koak JY. Effect of biomimetic deposition on anodized titanium surfaces. *J Dent Res.* 2011 Jun;90(6):711-6.
63. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials.* 2007 Nov;28(32):4748-55.
64. Elias CN, Oshida Y, Lima JH, Muller CA. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2008 Jul;1(3):234-42.
65. Coelho PG, Suzuki M. Evaluation of an IBAD thin-film process as an alternative method for surface incorporation of bioceramics on dental implants: a study in dogs. *J Appl Oral Sci.* 2005 Mar;13(1):87-92.
66. Coelho PG, Cardaropoli G, Suzuki M, Lemons JE. Early healing of nanothickness bioceramic coatings on dental implants. An experimental study in dogs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 Feb;88(2):387-93

67. Bose S, Roy M, Das K, Bandyopadhyay A. Surface modification of titanium for load-bearing applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2009 Dec;20 Suppl 1:S19-24.
68. Bressan E, Sbricoli L, Guazzo R, Tocco I, Roman M, Vindigni V, Stellini E, Gardin C, Ferroni L, Sivoilella S, Zavan B. Nanostructured surfaces of dental implants. *Int J Mol Sci*. 2013 Jan 17;14(1):1918-31.
69. Coelho PG, Lemons JE. Physico/chemical characterization and in vivo evaluation of nanothickness bioceramic depositions on alumina-blasted/acid-etched Ti-6Al-4V implant surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2009
70. Coelho PG, Marin C, Granato R, Giro G, Suzuki M, Bonfante EA. Biomechanical and histologic evaluation of nonwashed resorbable blasting media and alumina-blasted/acid-etched surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Jan;23(1):132-5.
71. Andreiotelli M, Wenz HJ, Kohal RJ. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Sep;20 Suppl 4:32-47.
72. Hobkirk JA, Wiskott HW. Ceramics in implant dentistry. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Sep;20 Suppl 4:55-7.
73. Liu H, Webster TJ. Mechanical properties of dispersed ceramic nanoparticles in polymer composites for orthopedic applications. *Int J Nanomedicine*. 2010; 5:299-313.
74. Li Z, Kawashita M. Current progress in inorganic artificial biomaterials. *J Artif Organs*. 2011 Sep;14(3):163-70.
75. Rajesh P, Muraleedharan CV, Sureshbabu S, Komath M, Varma H. Preparation and analysis of chemically gradient functional bioceramic coating formed by pulsed laser deposition. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Feb;23(2):339-48.
76. Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glassceramic (Biosilicate®). *J Biomed Mater Res A* 2007;82:545-547.
77. Tirapelli C, Panzeri H, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. *Braz Oral Res*. 2010 Oct-Dec;24(4):381-7.
78. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999; 87:57–66.
79. Huang Y, Wang Y, Ning C, Nan K, Han Y. Hydroxyapatite coatings produced on commercially pure titanium by microarc oxidation. *Biomed Mater*. 2007 Sep;2(3):196-201.
80. Takebe J, Itoh S, Okada J, Ishibashi K. Anodic oxidation and hydrothermal treatment of titanium results in a surface that causes increased attachment and altered cytoskeletal morphology of rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Biomed Mater Res*. 2000 Sep 5;51(3):398-407.



81. Zhang L, Han Y. Effect of nanostructured titanium on anodization growth of self-organized TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Nanotechnology*. 2010 Feb 5;21(5):055602.
82. Hollinger J, Wong M EK. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82:594–606.
83. Valderrama P, Bornstein MM, Jones AA, Wilson TG, Higginbottom FL, Cochran DL. Effects of implant design on marginal bone changes around early loaded, chemically modified, sandblasted Acid-etched-surfaced implants: a histologic analysis in dogs. *J Periodontol*. 2011 Jul;82(7):1025-34.
84. Davies JE, Hosseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies JE. *Bone engineering*. Toronto: Em squared incorporated; 2000. P. 1-14.
85. Park JW, Kwon TG, Suh JY. The relative effect of surface strontium chemistry and super-hydrophilicity on the early osseointegration of moderately rough titanium surface in the rabbit femur. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Mar 12.
86. Yokoyama K, Ichikawa T, Murakami H, Miyamoto Y, Asaoka K. Fracture mechanisms of retrieved titanium screw thread in dental implants. *Biomaterials* 2002;23:2459–65