



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MARIA FERNANDA LIMA VILLAÇA - CARVALHO

**EFEITO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO
DE NANOTEXTURIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE IMPLANTES
ATRAVÉS DE ANODIZAÇÃO**

2016

MARIA FERNANDA LIMA VILLAÇA - CARVALHO

**EFEITO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO DE
NANOTEXTURIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE IMPLANTES ATRAVÉS DE
ANODIZAÇÃO**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Adj. Mari Eli Leonelli de Moraes

Coorientadora: Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Villaça-Carvalho, Maria Fernanda Lima

Efeito na osseointegração de um novo método de nanotexturização de
superfície de implantes através de anodização / Maria Fernanda Lima
Villaça-Carvalho. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
106 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.

Orientadora: Mari Eli Leonelli de Moraes

Coorientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos.

1. Anodização. 2. Microtomografia. 3. Nanotecnologia. 4.
Osseointegração. I. de Moraes, Mari Eli Leonelli, orient. II. de
Vasconcellos, Luana Marotta Reis, coorient. III. Instituto de
Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual
Paulista. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita
Filho'. V. UNESP - Univ Estadual Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 29 de Janeiro de 2016
E-mail: mfervillaca@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Mari Eli Leonelli de Moraes (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. João Paulo Barros Machado

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais-INPE
Laboratório Associado de Sensores e Materiais, LAS

Prof. Dr. Natal Nerímio Regone

Curso de Engenharia de Telecomunicações
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus Experimental de São João da Boa Vista

Prof. Adj. Maria Aparecida Neves Jardim

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Ass. Dr. Sergio Lucio Pereira de Castro Lopes

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 29 de Janeiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os planos maravilhosos que teve e tem para mim; pela minha família e todas as pessoas que coloca em minha vida. Agradeço por todas as oportunidades, e por me ajudar a manter a mente sã mesmo nos momentos de dificuldade. Agradeço pelo dom da vida, por ser cercada de amor, e por confiar tarefas tão lindas a mim!

Ao meu marido, Rodrigo, que sempre acreditou em mim. Talvez tenha percebido mais do que eu, o quanto esta etapa e conquista seriam importantes para mim. Meu companheiro, incentivador, meu amor! Obrigada por me escolher, obrigada por confiar a mim “o projeto”, sem dúvida, mais lindo e desafiador de todos!!! Palavras não serão suficientes para descrever tudo o que significa para mim... Te amo!

Aos meus pais, Paulo César e Lêda, por todas as batalhas para que nunca faltasse nada a mim e meu irmão; sendo exemplos de retidão, trabalho, dedicação, honestidade.... Mas acima de tudo, muito obrigada pelos valores passados, por todo amor dedicado a nós, por toda torcida, por estarem sempre dispostos a ajudar. Amo vocês!

Ao meu irmão José Rodolfo, meu melhor amigo! Dizem que irmãos brigam, graças a Deus, esta nunca foi nossa realidade. Muito obrigada pela torcida, por sempre saber como me alegrar, por ser esta pessoa tão especial. Amo tanto que queria mais irmãos, aí você fez isso e me trouxe uma irmã, sua esposa Anahi. Agradeço a Deus por tê-la em nossa família, e por ser essa pessoa tão boa e meiga, que sei que está torcendo por mim nesta nova etapa!

À Professora Mari Eli Leonelli de Moraes, minha orientadora, que em um dos momentos mais difíceis em que estava passando, demonstrou

otimismo, confiança em Deus e seguiu em frente; sem dúvida foi uma grande lição para mim. Muito obrigada por aceitar me orientar, por acreditar nesta pesquisa, nesta idéia; sem o seu “sim” não teria chegado até aqui.

À minha co-orientadora, a Professora Luana Marotta Reis de Vasconcellos, por me aceitar quando fui procurá-la. Obrigada por acreditar e confiar em mim, por estar sempre disposta a ajudar, por dar todo suporte e incentivo em todos os momentos. Seu entusiasmo e amor pela pesquisa são exemplos para mim.

À Professora Heloisa Andrea Acciari por todo empenho e disposição nesta pesquisa, pela confiança em mim, e por ter me recebido sempre tão disposta.

Ao Professor Natal Nerímio Regone nas etapas de anodização, também sempre disposto a colaborar.

Ao Professor João Paulo Barros Machado por sempre me receber tão bem e por permitir as análises realizadas no Inpe.

A todos os amigos conquistados nestes anos de Pós Graduação. Tivemos momentos de muito estudo, preocupação, porém de muita amizade e divertimento. Levarei estes momentos para eternidade e todos em meu coração. Sei que cada um segue seu rumo, mas espero sempre poder recontrá-los!

A todos os docentes do Programa de Pós Graduação em Biopatologia Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, pela amizade, todos os ensinamentos transmitidos no decorrer da minha formação acadêmica, pela acolhida e por acreditarem em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, em especial a Prof^a Adj. Juliana Campos Junqueira, coordenadora do curso, pela amizade, exemplo profissional e dedicação a todos os discentes.

Aos secretários do Programa de Pós-graduação, pela atenção e auxílio durante esses anos.

A todos os funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus São José dos Campos – UNESP, pela ajuda sempre que solicitados.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus São José dos Campos, na pessoa do Diretor Prof^o Titular Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Profa Adj. Rebeca Di Nicoló, pela oportunidade de realização do curso de graduação e pós-graduação, por todo conhecimento adquirido, e principalmente por tantos momentos inesquecíveis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de Doutorado.

À TITANIUM FIX, por conceder os implantes para esta pesquisa e acreditarem no projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Osseointegração	14
2.1.1 Osteoindução, osteocondução, osteogênese e osseointegração ...	17
2.2 Rugosidade	18
2.3 Tipos de Superfície	19
2.3.1 Superfície Usinada.....	21
2.3.2 Adição	22
2.3.2.3 Superfícies Biomiméticas.....	23
2.3.3 Subtração.....	24
2.3.4. Nanoestruturas	26
2.3.4.1 Anodização	27
2.3.5 Estudos que compararam diferentes superfícies de implantes.....	30
2.4 Histomorfometria	36
2.4.1 Microtomografia Computadorizada (μ TC)	37
2.4.1.1 Estudos com μ TC	38
3 DETALHAMENTO METODOLÓGICO	41
3.1 Implantes	41
3.2 Procedimento de Anodização	42
3.3 Caracterização dos Implantes	44
3.4 Procedimentos Cirúrgicos	46
3.5 Anestesia	46
3.6 Instalação dos implantes	46
3.7 Eutanásia	48

3.8 Análise por Radiografia periapical (RP)	49
3.9 Avaliação por Microtomografia Computadorizada (μTC)	51
3.10 Teste por remoção de torque	55
3.11 Avaliação da citotoxicidade por MTT	56
3.11.1 Procedimento de cultura de células	56
3.11.2 Isolamento de células da linhagem osteoblástica e desenvolvimento de cultura primária osteogênica	57
3.11.3 Determinação da viabilidade celular (ensaio de citotoxicidade)	57
3.12 Análise Estatística	58
4 ARTIGO	59
4.1 Effect on osseointegration of a new method of nano-texturing implant surface by Anodization	59
5 REFERÊNCIAS	96
ANEXO	105

Villaça-Carvalho MFL. Efeito na oseointegração de um novo método de nanotexturização de superfície de implantes através de anodização. [tese] São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

A Implantodontia é uma das áreas da Odontologia que mais tem evoluído nas últimas décadas. Diversos estudos são desenvolvidos na intenção de otimizar o processo de oseointegração utilizando a nanotopografia na superfície dos implantes. Atualmente o processo de anodização da superfície vem se destacando entre estas técnicas. Desta forma, o objetivo nesta pesquisa foi obter nano rugosidades e fase de anatase em implantes odontológicos de Titânio, buscando a otimização da oseointegração. Sessenta implantes foram caracterizados quanto à morfologia, por meio de microscopia de força atômica (AFM) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); quanto à composição química, por análise por detector de espectrometria por espalhamento de energia (EDS) e Espectroscopia Raman; e por fim, quanto ao potencial de corrosão, pela análise de impedância eletroquímica (EIE). A osteogênese, *in vivo*, foi comparada por Radiografia periapical (RP), Microtomografia Computadorizada (μ TC) e teste de remoção por torque reverso; e, a análise *in vitro*, foi realizada por teste de citotoxicidade por MTT [(brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol]. Os implantes foram divididos em: G1 (controle); Grupo 2 (jateado); Grupo 3 (anodizado-experimental). Cada coelho recebeu um implante de cada grupo nas tíbias direita e esquerda, e cinco coelhos, foram eutanasiados 2 e 6 semanas após a cirurgia. Os implantes da tíbia direita foram submetidos à RP e à μ TC; e os da tíbia esquerda, ao teste de torque reverso e análise de citotoxicidade por MTT. AFM e MEV comprovaram a presença de nano rugosidades na superfície em G3; análises de EDS e Espectroscopia Raman, demonstraram aumento da camada do filme de TiO_2 e a obtenção de anatase em G3. Na RP, nenhum implante apresentou halo radiolúcido. Na μ TC, G3 foi sempre superior aos demais grupos nos parâmetros observados: BV, BV/TV, Tb.Th. No teste de torque reverso, houve

necessidade de maior força de remoção dos implantes anodizados. No teste por MTT, os implantes experimentais foram atóxicos células. Conclui-se que a anodização utilizada neste estudo afetou positivamente a composição química e estrutural do filme de TiO_2 , melhorando suas características biológicas na osseointegração.

Palavras-chave: Anodização. Microtomografia. Nanotecnologia. Osseointegração.

Villaça-Carvalho MFL. *Effect on osseointegration of a new method of nano texturing implant surface by anodization [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.*

ABSTRACT

The Implantology is one of the areas of dentistry that has most evolved in recent decades. Many studies have been developed with the intention of optimizing the osseointegration process using nanotopography on the surface of the implants. Currently the surface of the anodizing process has stood out among these techniques. Thus, the aim of this research was to obtain nano roughness and anatase phase in dental Titanium implants, seeking for the optimization of the osseointegration. Sixty implants were characterized for morphology by atomic force microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM); in chemical composition, by mass spectrometry detector energy scattering (EDS) and Raman spectroscopy; and finally, as the potential for corrosion, the electrochemical impedance analysis (EIS). Osteogenesis *in vivo* was compared by Periapical Radiography (PR), Computed Microtomography (μ TC), removal reverse torque test; and *in vitro* analysis, it was performed by MTT cytotoxicity assay [(bromide 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazoliol]. The implants were divided into G1 (control); Group 2 (sandblasted); Group 3 (anodized-experimental). Each rabbit received an implant of each group in the right and left tibias and five rabbits were euthanized 2 and 6 weeks after surgery. The implants of the right tibia underwent PR and μ TC; and the left tibia, the reverse torque test and MTT cytotoxicity assay. AFM and SEM confirmed the presence of nano roughness on the surface in G3; EDS analysis and Raman spectroscopy showed increased TiO₂ film layer and obtainment of anatase G3. In PR, no implant presented radiolucent halo. In μ TC, G3 has always been higher than the other groups in the observed parameters: BV, BV / TV, Tb.Th. In the reverse torque test, it was required greater removal force of anodized implants. In the MTT test, the experimental implants were nontoxic to cells. It was conclude that the anodizing process used in this study positively affected the chemical and structural composition of TiO₂ film, improving their biological characteristics at osseointegration.

Keywords: Anodizing. Microtomography. Nanotechnology.
Osseointegration

1 INTRODUÇÃO

O uso de implantes como forma de tratamento odontológico tem sido amplamente utilizado nos últimos anos (Chilvarquer et al., 2005), e visando acelerar o processo de osseointegração, atualmente, há uma grande preocupação com a topografia de superfície destes (Zuo et al., 2013; Lai et al., 2009; Lang et al., 2011). Após a implantação de um biomaterial no corpo, inicialmente ocorre a interação das células com a superfície deste; portanto, a avaliação da interface substrato-célula é crucial para a concepção de um implante com sucesso (Shokuhfar et al., 2014).

Buscando otimizar o processo de osseointegração, diversos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar os efeitos de modificações na superfície dos implantes neste microambiente. Diversos autores observaram que estas modificações podem ser capazes de acelerar e melhorar a qualidade da osseointegração, resultando em maior deposição óssea e redução do período de reparo (Shokuhfar et al., 2014; Zuo et al., 2013; Polizzi et al., 2013; Vasconcellos et al., 2012; Lai et al., 2009; Wennerberg et al., 2009; Lang et al., 2011; Stanford, 2010; Buser et al., 2004).

Diferentes modificações topográficas e químicas são utilizadas em implantes osseointegráveis para modular a resposta óssea. A nanotecnologia oferece alternativas para alterar as superfícies destes implantes. Estas modificações exibem nanoestruturas características que podem aumentar o crescimento e a fixação de células mesenquimais e de osteoblastos devido a um aumento da área de superfície que proporciona melhores condições para a interação célula-substrato, tais como maior

energia de superfície, maior adsorção de proteínas; que resultarão em maior adesão celular (Shokuhfar et al., 2014; Doroudian et al., 2013; Yu et al., 2010; von der Mark et al., 2010). Segundo Yao et al., (2008), as características nanométricas podem simular o ambiente celular. A superfície deve funcionar adequadamente nos momentos iniciais do processo até anos mais tarde suportando as forças da mastigação, isto é, a superfície deve atrair biomoléculas adequadas para a resposta óssea e ao mesmo tempo transmitir satisfatoriamente a tensão na interface osso-implante por vários anos (Meirelles, 2010).

O interesse pela obtenção da nanotopografia por meio do processo de anodização vem crescendo, uma vez que esta técnica exhibe adequada modificação de superfície, resultando em um efeito positivo sobre as atividades celulares (Li et al., 2012; Adamek, Jakubowicz, 2010; Yu et al., 2008), além de ser um processo de baixo custo e eficiente reprodutibilidade. De acordo com Williamson et al., (2013), a anodização é um método eletroquímico de modificação de superfície que melhora a bioatividade de implantes ortopédicos e dentários de titânio. Assim, a superfície anodizada exhibe uma topografia única com boa capacidade para reter líquidos e tecido ósseo (Al-Nawas et al., 2008).

O processo de anodização pode gerar nano rugosidades e/ou poros na superfície dos implantes, além de permitir a formação de um filme de dióxido de Titânio (TiO_2) mais cristalino, favorecendo o crescimento de células osteoblásticas em diferentes orientações, resultando num processo de osseointegração mais eficaz. Estudos demonstram que a anodização é utilizada para aumentar e estabilizar a espessura do filme TiO_2 (Habazaki et al., 2003; Al-Nawas et al., 2008) que recobre espontaneamente o titânio devido à sua alta afinidade com o oxigênio. Após o processo de anodização, as superfícies nanotexturizadas apresentam a estabilização da camada de TiO_2 , atraindo mais células osteoblásticas, e promovendo uma neoformação óssea mais rápida (Li et al., 2012; Adamek, Jakubowicz, 2010; Yu 2008; Castner,

Ratner, 2013; Doroudian et al., 2013; Lavenus et al., 2012; Li et al., 2012; Niinomi, 2008; El-wassefy et al., 2014).

O objetivo da maioria das pesquisas na área da Implantodontia é avaliar, comparar ou quantificar a neoformação óssea na interface osso-implante. A análise histomorfométrica da interface osso-implante pode ser realizada por diferentes técnicas de observação como a microscopia óptica, a microscopia eletrônica de varredura e a μ CT (Park et al., 2005).

Neste contexto, propõe-se comparar a neoformação óssea na interface de implantes superfície usinada (controle), rugosa (comercial) e nanotexturizada submetida à anodização (experimental), por meio da μ TC, radiografia periapical e teste de torque reverso; em tíbias de coelhos, bem como avaliar a citotoxicidade das diferentes superfícies.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Osseointegração

O conceito de Osseointegração fundamentado pelo professor Branemark, consiste em “uma conexão direta, estrutural e funcional entre o osso vital organizado e a superfície de um implante de titânio capaz de receber carga funcional” (Branemark et al., 1969).

O termo osseointegração foi usado inicialmente para descrever o contato direto entre o osso vivo e um implante sem a interposição de camadas de tecido fibroso (Branemark et al., 1977), e em nível de microscopia óptica (Albrektsson et al., 1981) (Figura 1).

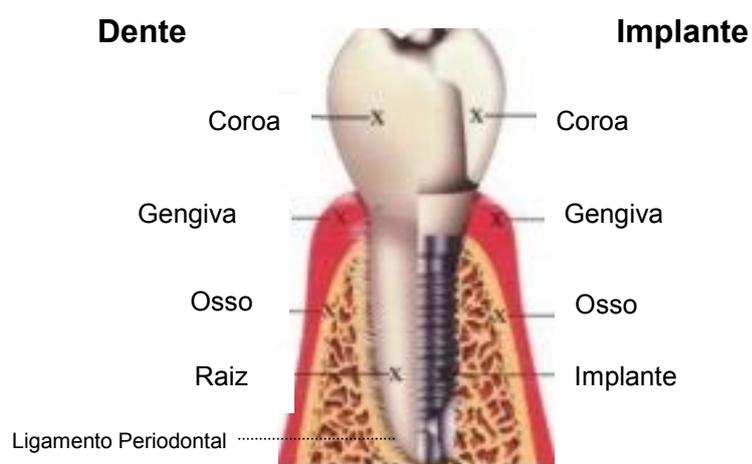


Figura 1-Esquema demonstrativo, comparando fixação do dente ao osso alveolar e do implante ao tecido ósseo alveolar (Instituto do Sorriso, 2010).

O objetivo inicial dos estudos era analisar as reações de injúria e reparação dos tecidos em diversas regiões anatômicas de diferentes animais, com atenção especial para a função e estrutura microvascular do tecido ósseo nesses processos. As pesquisas iniciais foram feitas por meio da observação da regeneração da medula óssea, em fíbula de coelhos, que era exposta para a instalação de uma objetiva, feita em titânio, de um microscópio óptico para análise *in situ* e *in vivo*. Por meio de uma técnica cirúrgica delicada, a cicatrização dos vasos sanguíneos da medula foi estudada, após o osso cortical ter sido preparado. Assim, foi possível a realização de diversos estudos *in vivo* do osso cortical, medular e dos tecidos articulares com ênfase na reação dos tecidos a diversos tipos de trauma e, conseqüentemente, as diversas possibilidades para minimizar tais danos. Esses estudos sugeriram a possibilidade de ancoragem óssea. O objetivo seguinte era estabelecer um conjunto de procedimentos clínicos para a colocação de próteses que permitissem uma cicatrização completa do tecido ósseo e que permanecessem estáveis ao longo dos anos (Branemark, 1983).

De acordo com Davies, Wong (1996), a osseointegração está associada às respostas celulares que contribuem para a formação de osso na superfície dos implantes. Inicialmente, a superfície dos implantes entra em contato com o sangue. Com isso, duas considerações devem ser feitas quando um implante é instalado. A primeira é que a superfície de titânio entra em contato primeiro com o coágulo e as células sanguíneas. Ocorre assim uma adesão de proteínas do sangue, como plaquetas e fibrinogênio, á superfície do TiO₂ anteriormente á adesão de células osteogênicas, formando uma rede de fibrina. Sendo assim, as células osteogênicas interagem não diretamente com a camada de TiO₂, mas com uma camada de TiO₂ modificada por células sanguíneas. A segunda consideração é que essa camada de TiO₂, modificada por células sanguíneas, é regulada por características químicas e topográficas da superfície do implante. Características que influenciam na

natureza da composição subsequente do filme de proteínas que é adsorvido na superfície do implante e guiam a osteogênese. Após a aposição das células sanguíneas sobre a superfície do implante, uma matriz óssea mineralizada é formada, a partir da qual ocorre o processo de formação óssea. O osso neoformado passa por um processo de remodelação, que cria em sítios específicos, uma interface osso-implante compreendida entre a matriz mineralizada e um osso mais velho. Na opinião do autor, estes processos são extremamente dependentes da topografia do implante.

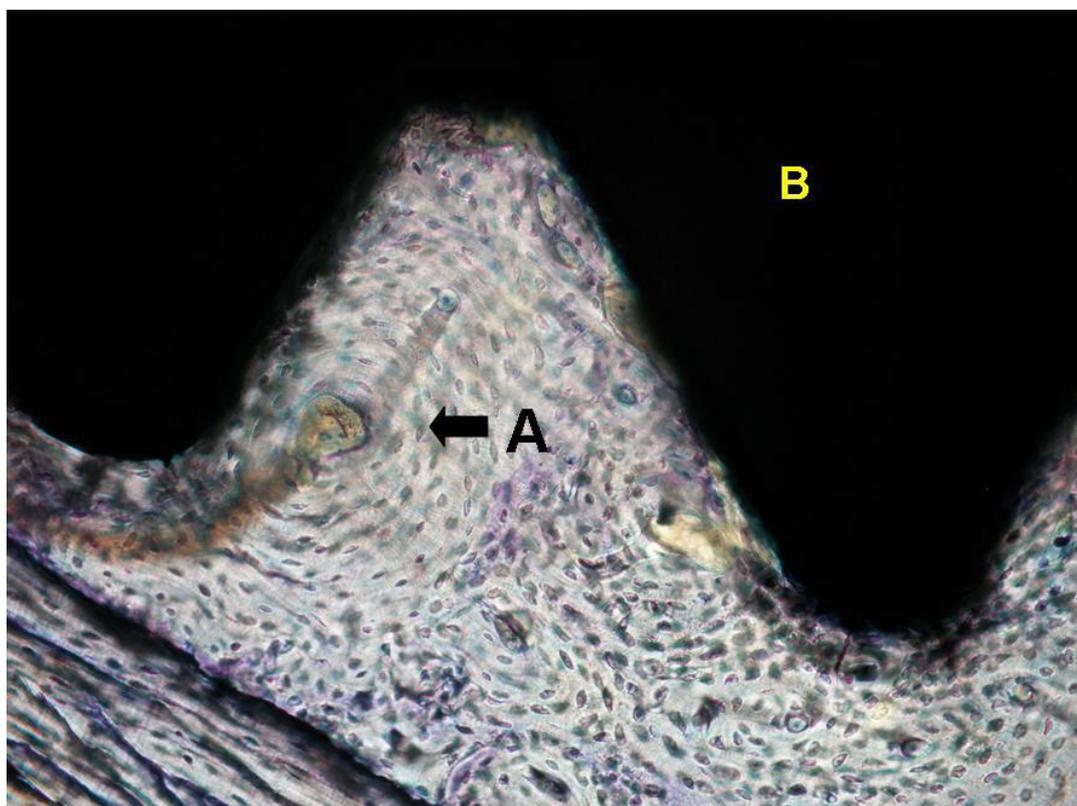


Figura 2-Fotomicrografia de secção longitudinal de um implante mostrando um passo de rosca totalmente osseointegrado. A) Tecido ósseo organizado evidenciando os Sistemas de Havers; B) implante. Experimento em coelho. Aumento original de 200X, corado com azul de toluidina a 1% (López, 2007).

2.1.1 Osteoindução, osteocondução, osteogênese e osseointegração

O contato inicial da superfície de titânio ocorre assim que o implante é instalado, devido à presença de coágulo sanguíneo. Desta forma, há uma interação inicial caracterizada pela adesão de plaquetas e fibrinogênio na superfície do implante, a qual apresenta camada superficial de TiO_2 . Em seguida, ocorre a adesão de células osteogênicas, resultando na formação de uma rede de fibrina. Após a aposição de células sobre a superfície do implante, a deposição e posterior mineralização de matriz óssea é iniciada (Davies, 1998).

O processo de cicatrização do tecido ósseo, após a instalação de um implante, pode ser dividido basicamente em três etapas: osteocondução, neoformação e remodelação óssea. Na fase de osteocondução, a reparação da ferida cirúrgica começa logo após a instalação do implante por meio da formação do coágulo (Davies, 1998).

De acordo com Carr et al., (1997), uma vez que a função primária dos implantes orais é a de promover suporte e estabilidade funcional para a substituição de elementos dentários perdidos, torna-se importante a compreensão da biologia de formação e remodelação do tecido ósseo ao redor dos implantes.

Por volta do 4º dia após a instalação do implante, células mesenquimais indiferenciadas migram em direção à superfície do implante, por meio do tecido conjuntivo frouxo formado. Enquanto não estiverem secretando matriz óssea, estas células continuarão migrando e se diferenciando em osteoblastos. Ocorre também, a formação de uma rede de fibrina que se adere à superfície do implante. Essa rede de fibrina permite a migração de células mesenquimais indiferenciadas, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e células linfoides. Durante a migração das células mesenquimais indiferenciadas, a rede de fibrina se retrai acelerando seu processo de diferenciação celular. Quando ocorre a

fibrinólise do coágulo, um tecido conjuntivo frouxo é formado, tecido este que serve de guia para a angiogênese. A capacidade de ancoragem dessas células á superfície do implante varia de acordo com as características da mesma. Em torno de uma semana, as células mesenquimais em diferenciação secretam matriz orgânica sem colágeno, que fornecem locais específicos para a deposição de fosfato de cálcio. Nesses locais específicos ocorre o crescimento dos cristais de fosfato de cálcio e, simultaneamente, ocorre aposição de fibras colágenas na interface formada. Finalmente, ocorre a calcificação da porção colágena, tanto das fibras quanto da região entre as fibras. Assim, no processo de neoformação óssea, a porção colágena fica separada da superfície do implante por uma camada de tecido calcificado livre de colágeno (Brunsky et al., 2000)

Osteoindução ocorre quando células mesenquimais indiferenciadas devidamente estimuladas; por exemplo, trauma; transformam-se em pré-osteoblastos e, em seguida, osteoblastos, iniciando o processo de osteogênese. A osteogênese pode ocorrer sobre uma determinada superfície ou arcabouço, sendo este processo denominado osteocondução. O processo de osseointegração depende previamente de osteoindução e osteocondução, que são fenômenos inter-relacionados, mas não idênticos (Albrektsson, Johansson, 2001).

2.2 Rugosidade

Albrektsson et al. (1981), afirmaram que alguns fatores como a biocompatibilidade, o desenho do implante, as condições da superfície do implante, o estado do hospedeiro, a técnica cirúrgica e o controle das cargas após a instalação são determinantes para o sucesso

da osseointegração.

No que se refere à rugosidade superficial, é bem estabelecido pela literatura que a presença de rugosidade na superfície dos implantes resulta em melhorias no processo de osseointegração. Assim, o aumento da rugosidade superficial tem sido associado a diversas vantagens, tais como: aumento na área de contato entre osso-implante, aumento na adesão celular na superfície do implante e aumento na interação bioquímica entre o implante e o tecido ósseo (Gupta et al., 2010).

De fato, o processo de crescimento de células sobre a superfície do implante se mostra dependente da rugosidade, uma vez que superfícies lisas apresentam maior proliferação celular ao longo das ranhuras decorrentes do processo de usinagem, caracterizando uma forte direcionalidade. Contudo, culturas de células realizadas na presença de superfícies tratadas (as quais apresentam maior rugosidade) resultam em menor direcionalidade, o que resulta em uma melhor interação das células com a superfície do implante (Elias, Meirelles, 2010).

2.3 Tipos de Superfície

Os trabalhos iniciais sobre osseointegração (Branemark et al., 1969; Albrektsson et al., 1981) utilizaram implantes de titânio comercialmente puro, com superfície usinada. Os implantes eram instalados na região anterior da mandíbula ou maxila, unidos, para uma melhor distribuição da carga mastigatória, com o propósito de reabilitar pacientes edentados totais.

Segundo Adell et al., (1981) as características da superfície dos implantes influenciam diretamente no comportamento das

células no que se refere a adesão, proliferação, alterações morfológicas e funcionais.

Obviamente, áreas com maior volume de osso cortical apresentam maior contato do implante com o tecido ao final da instalação. Além disso, superfícies tratadas de implantes resultam em um consequente aumento da área de contato osso-implante em relação a implantes lisos. Por este motivo, o uso de implantes com superfície tratada foi originalmente mais indicado para situações de leito ósseo pobre, ou seja, com menor contato osso-implante ao final da cirurgia, como no caso de regiões de enxertia e pacientes com comprometimentos sistêmicos (Wennerberg et al., 1995).

Albrektsson 1988 relatou que os implantes originais de Branemark eram reconhecidos como um padrão ouro, baseado em muitos estudos longitudinais. Tais implantes eram usinados com uma mínima rugosidade na superfície, entre 0,5 μm e 1,0 μm .

A alta taxa de sucesso dessa modalidade de tratamento levou a uma extrapolação da técnica. Assim, implantes orais foram instalados em regiões de pior qualidade óssea. As altas taxas de sucesso obtidas com implantes de superfície usinada já não eram observadas. Além deste fator, a busca por tempos de cicatrização menores contribuíram para o estímulo à pesquisa e ao desenvolvimento de novas superfícies de implantes. (Groisman, Vidigal, 2005).

Castilho et al., (2006) publicaram que o sucesso clínico é conseguido não só por causa do material do implante, mas também por causa de outras propriedades como desenho, tratamento e qualidade de superfície, além de outras implicações como técnica cirúrgica, qualidade óssea e suporte de carga. A composição química da superfície dos implantes pode variar consideravelmente devido à fabricação e acabamento, como usinagem, tratamento térmico, decapagem e até mesmo procedimentos de esterelização. Baseado nestas considerações, um controle cuidadoso da composição da superfície de implantes torna-se

um procedimento relevante para a produção de alta qualidade destes dispositivos.

Silva (2006) relatou que a rugosidade deve ser controlada, pois as células necessitam de pontos de ancoragem na superfície dos implantes, para iniciar a proliferação e constituir a biofixação dos implantes. Se as rugosidades forem muito menores que o tamanho das células, não existirão sítios de biofixação adequados. Em contrapartida, se a superfície apresentar grandes picos ou vales, mas se estes possuírem superfícies lisas, as células poderão não encontrar sítios de biofixação adequados. Para os autores, a adesão e o espalhamento de células em superfícies de implantes são associados à microestrutura superficial.

Para Palmquist et al., (2010) a deposição de tecido ósseo na superfície dos implantes é fortemente dependente das interações entre as células e a superfície do titânio dos implantes.

2.3.1 Superfície Usinada

Para Sykaras et al., (2000) as ranhuras superficiais são consideradas de extrema importância para o processo de adesão celular e produção de matriz proteica.

De acordo com Teixeira (2001), devido à presença de microrranhuras superficiais resultantes do processo de corte ou usinagem da peça metálica, esta não exhibe características de completa lisura superficial.

Elias et al., (2002) explicaram que os implantes orais usinados passam por processos de limpeza, passivação, descontaminação e esterelização. As ranhuras superficiais de usinagem

direcionam o crescimento das células esparramadas e somente naquele sentido.

Elias et al., (2004) relataram que um implante usinado permite o processo de mineralização do osso em direção ao implante, mas não possui uma superfície indutora.

Pinto e Elias (2006) observaram em microscópio que a orientação das estrias e sulcos da superfície usinada seguem o sentido do corte, dificultando o espalhamento das células, tornando-se uma superfície anisotrópica.

As superfícies lisas ou usinadas são caracterizadas por uma maior lisura superficial em decorrência do processo de usinagem dos implantes. No entanto, ranhuras são observadas após este processo, resultando em superfícies que não são completamente lisas (Wennerberg, Albrektsson, 2009).

2.3.2 Adição

Um dos primeiros métodos de tratamento de superfície foi a adição de HA à superfície dos implantes. Através desse método, buscava-se uma ligação química entre o implante recoberto com HA e o tecido ósseo. Contudo, esta técnica caiu em desuso por apresentar desvantagens como alto custo de fabricação e pelo fato de alguns estudos *in vivo* demonstrarem que há destacamento da camada de HA do corpo do implante (Gottlander et al., 1992).

A HA é uma cerâmica formada basicamente por cálcio e fosfato e é encontrada em abundância no esmalte dentário, na dentina e nos ossos. O interesse na sua utilização para o recobrimento de implantes deve-se ao fato de sua composição química ser semelhante á

fase mineral do tecido ósseo (Caulieret et al., 1997).

Diferentes processos de recobrimento utilizam como matéria prima a HA, resultando em superfícies com diferentes morfologias e propriedades, até dentro de um mesmo lote de um mesmo fabricante, sendo difícil a obtenção de uma camada fina e uniforme de HA quando da sua aplicação em superfícies geométricas complexas, tais como roscas ou superfícies porosas de metal (Suchanek, Yoshimura, 1998).

Outro método de adição bastante comum é o de aspensão térmica por plasma; onde a chama ionizada de um gás é aquecida a temperaturas muito altas, 10000 e 30000 °C, e partículas aquecidas do material de recobrimento são lançadas em altas velocidades contra o corpo do implante. Após o contato com o corpo do implante, as partículas resfriam e solidificam-se, e a superfície adquire um aspecto de lava vulcânica solidificada (Groissman, Vidigal, 2005).

2.3.2.3 Superfícies Biomiméticas

Atualmente, é possível depositar camadas de fosfato de cálcio sob condições fisiológicas de temperatura e pH pelo processo biomimético. Uma vez que as moléculas estão integradas à estrutura do material, elas são liberadas gradualmente, na medida em que as camadas vão se degradando, o que aumenta o potencial de servirem como um sistema de liberação lento de agentes osteogênicos para o sítio de implantação (Liu et al., 2001).

De acordo com Liu et al., 2002, outra vantagem do processo de cobertura biomimética é que moléculas biologicamente ativas, como agentes osteogênicos, podem ser precipitadas com componentes inorgânicos para formarem uma matriz com propriedades tanto osteoindutora quanto osteocondutora.

Nesse processo, células mesenquimais foram isoladas de biópsias da medula óssea, expandidas in vitro e então cultivadas na superfície dos implantes, carregando uma camada de fosfato de cálcio e de BMP-233, criando implantes osteoindutores (fatores de crescimento) e osteocondutores (camada de fosfato de cálcio) (Yeo et al., 2008).

2.3.3 Subtração

Nos métodos de subtração, para obter uma superfície rugosa, são utilizadas técnicas de ataque ácido à superfície, ou as superfícies são jateadas com óxidos ou areia. Muitas vezes faz-se uma combinação desses métodos (jateamento e ataque ácido) para obter o grau de rugosidade desejado. Os principais ácidos utilizados no tratamento por ataque ácido são o ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) em determinadas concentrações. Os principais métodos de jateamento são por óxidos como, por exemplo, óxido de alumínio (Al₂O₃). Desta forma, tem-se uma superfície com ranhuras irregulares, que variam de acordo com o tamanho e a forma das partículas e também as condições do jateamento (pressão, distância do bico do jato à superfície do implante, tempo de jateamento). A rugosidade média pode variar entre 1,20 e 2,20 µm (Ivanoff et al., 2001).

Para Christenson et al. (2007), não há dúvidas de que a topografia das superfícies influencie diretamente na formação óssea sobre o implante. Em uma escala micrométrica, os tratamentos de superfície proporcionam superfícies favoráveis à osseointegração. Porém, atualmente a indústria direciona suas pesquisas para a escala nanométrica. Na opinião dos autores, modificações na superfície na escala nanométrica afetam tanto a topografia quanto as propriedades

químicas da superfície.

As modificações que alteram as interações da superfície as fazem por meio de íons, biomoléculas e células, influenciando na adesão e proliferação celular. Diferenciação e adesão de células específicas que vão interferir no processo de osseointegração potencializam seus efeitos. Assim, algumas situações da atividade clínica diária podem ser beneficiadas, tais como protocolos de carga imediata, instalação de implantes em alvéolos de extração, instalação de implantes e enxertos simultâneos, áreas estéticas onde a preservação do nível ósseo é fundamental, instalação de implantes em locais de baixa densidade óssea, situações em que seja necessário instalar implantes curtos.

Atualmente, alguns métodos de tratamento de superfície atuam na escala nanométrica. Um dos métodos utiliza um jateamento com TiO_2 , seguido por um tratamento com ácido fluorídrico (OsseoSpeed-Astra Tech AB, Mondal, Suécia). Outro método consiste em um depósito de nanopartículas de cálcio e fosfato sobre uma superfície previamente tratada com duplo ataque ácido (Nanotite-Biomet 3i, Palm Beach Gardens, FL, EUA). Ambos os tratamentos vem demonstrando bons resultados, porém são necessários mais estudos em escala nanométrica para avaliar verdadeiros riscos e benefícios (Mendonça et al., 2008).

De acordo com Al-Nawas et al., (2008), o método de obtenção da superfície de TiO_2 porosa é eletroquímico, chamado de oxidação anódica. A média de diâmetro dos poros fica em torno de 1 a 2 μm . Esse tipo de superfície exibe uma tipografia única, sem características agudas e com boa capacidade para reter líquidos e tecido ósseo. A camada de óxido é fortemente aderente ao metal subjacente, com ótima resistência ao desgaste, o que indica risco mínimo de liberação de partículas durante a inserção do implante.

Atualmente, a nanotecnologia oferece diferentes alternativas para modificar as superfícies de implantes osseointegráveis. Em paralelo, algumas técnicas com resolução na escala nanométrica

estão contribuindo com informações importantes sobre a interação celular/tecidual e o material implantado (Meirelles, 2010).

2.3.4. Nanoestruturas

Para ser classificada como uma nanoestrutura, uma estrutura deve ter ao menos uma das três dimensões variando entre 1 a 100 nanômetros. O limite máximo de 100 nanômetros é baseado no Sistema Internacional de Unidades (The International System of Units) (Aumailley, Gayraud, 1998).

Elias e Serra (2006) relataram que o tratamento eletroquímico das superfícies dos implantes submetidos ao processo de oxidação anódica aumentaram a espessura da camada de óxido. Na visão dos autores, as modificações por anodização permitem uma melhor adesão e orientação das células e uma osseointegração mais acelerada; uma vez que a superfície possui poros abertos e irregulares semelhantes a vulcões, que crescem na superfície do implante.

Yang (2009) avaliaram que o tratamento eletroquímico por anodização aumentaram a espessura da camada de óxido de Ti da superfície metálica dos implantes. Esta camada de TiO_2 melhorou significativamente toda a coagulação do sangue e aderência em células da medula óssea humana.

Para Meirelles (2010), a presença de nanoestruturas, independente da composição química, resulta em aumento do contato osso-implante. Segundo o autor, o próximo passo seria determinar o tamanho e a distribuição ideal das nanoestruturas na superfície para melhorar a resposta óssea. A resposta óssea na interface osso-implante é dependente do fator tempo e esta característica representa um desafio

extra para o desenho da superfície ideal para implantes osseointegráveis. A superfície deve funcionar adequadamente nos momentos iniciais do processo inflamatório até anos mais tarde suportando as forças dinâmicas de mastigação, isto é, a superfície deve atrair biomoléculas adequadas para a resposta óssea e ao mesmo tempo permitir a transmissão adequada da tensão na interface osso-implante por vários anos.

2.3.4.1 Anodização

Na anodização a superfície de um metal é transformada numa camada de óxido, através da passagem de corrente elétrica e outros parâmetros, como o tipo de solução eletrolítica. Além de proteger o metal, a camada de óxido formada anodicamente exibe coloração em muitas tonalidades diferentes (Santos Junior, 2005).

O titânio é recoberto espontaneamente por um filme fino de TiO_2 devido à sua alta afinidade com o oxigênio, sendo a anodização um processo eletroquímico utilizado para aumentar a espessura do filme de óxido. A formação da camada interna do filme de TiO_2 em elevados potenciais anódicos ocorre pela migração de íons $\text{O}^{2-}/\text{OH}^-$ em direção à interface metal/filme. Por outro lado, os íons Ti^{4+} originários do substrato de Ti migram para a interface filme/eletrólito formando a camada mais interna do filme anódico. Em geral, os óxidos cristalinos têm maior resistividade iônica, e por esta razão necessitam de campos elétricos mais altos do que óxidos amorfos. Então, a probabilidade de excitação de elétrons na banda de valência, originada pela sobreposição de orbitais $\text{O } 2p$ no filme de TiO_2 cristalino, conduz à oxidação de íons O^{2-} para formar moléculas de O_2 e posterior desenvolvimento de bolhas. As reações

anódicas ocorridas no filme são variadas. As mais relevantes no crescimento do filme são aquelas que formam O_2 e TiO_2 . O filme pode ser dividido em duas camadas, onde aproximadamente 65% da espessura corresponde à camada interna. Esta camada mais interna do óxido apresenta cristais de anatásio. Contrariamente, a camada mais externa do filme é amorfa. Entre estas duas subdivisões, há uma interface onde ocorre a transição de cristalinidade (Habazaki et al., 2003).

A anodização é uma técnica de modificação de superfície fundamentada na oxidação do metal para formar filmes uniformes e relativamente espessos à temperatura ambiente. Esta técnica também pode ser utilizada para incorporar elementos químicos do eletrólito com o objetivo de melhorar as propriedades protetoras do metal (Narayanan, Seshadri, 2007).

Dentre os vários métodos para melhorar as propriedades interfaciais e aumentar o tempo de vida dos implantes, a anodização têm atraído grande atenção dos pesquisadores, devido à sua simplicidade e facilidade para manipular os parâmetros experimentais na obtenção de filmes microporosos ou nanoporosos (Yu et al., 2008).

O processo eletroquímico de anodização de metais permite a obtenção de uma camada de óxidos relativamente fina e mais densa que aquela formada naturalmente na atmosfera. No caso do titânio, esta camada tem sido utilizada para favorecer a nucleação de apatitas e, por conseguinte, a osteointegração (Adamek, Jakubowicz, 2010).

De acordo com Williamson et al., (2013), a anodização é um método eletroquímico de modificação de superfície que melhora a bioatividade de implantes ortopédicos e dentários de titânio; sendo que a utilização do ácido sulfúrico é a rota principal usada nos processos. De acordo com os autores, há três as formas cristalinas conhecidas do TiO_2 : brooquita, rutilo e anatase; sendo o rutilo, a forma mais estável termodinamicamente, comumente usado como pigmento branco em tintas e cosméticos, e a anatase a forma obtida às temperaturas mais baixas e

utilizada em numerosos campos de aplicação, incluindo aplicações médicas. O objetivo dessa pesquisa foi investigar a cristalinidade e óxido durante a formação de poros por anodização de titânio usando uma forma de onda pulsada numa série eletrólitos de ácido sulfúrico. A forma de onda pulsada mostrou produzir poros. Os autores concluíram que as distribuições de tamanho dos poros produzidos podem ser benéficos para o osso a ligação de células e proliferação.

Yamagami et al., (2014) demonstraram que em aplicações dentárias, o contato entre o implante metálico e a loja cirúrgica de tecido vivo é obtido por meio da camada de óxido da superfície do implante, permitindo o processo de osseointegração. Em Odontologia, a camada passiva formada no titânio parece ser mais estável e oferecer maior proteção do que aquele formado nas ligas de Ti, habitualmente utilizadas em outras aplicações médicas.

Shokuhfar et al., (2014) analisaram a interação dos osteoblastos em titânio comercialmente puro e na liga Ti_6Al_4V exibindo TiO_2 amorfo e cristalino. A cristalinidade do filme foi demonstrada pela fase de anatase, obtida pelo processo de anodização. Esta pesquisa mostrou que a composição química do substrato foi mais importante para aumentar a densidade celular do que a morfologia de superfície. Os autores concluíram que a alta molhabilidade da superfície devido à cristalinidade exibiu maior influência no espalhamento celular devido à hidrofiliabilidade da superfície cristalina em comparação com a amorfa.

El-wassefy et al., (2014), realizaram um estudo visando obter nanoestruturas na superfície dos implantes de titânio por processo de oxidação anódica com o objetivo de avaliar a bioatividade resultante tanto *in vitro* como *in vivo*. Para isso, um protocolo econômico foi usado para aplicar descarga anódica em superfície de titânio comercialmente puro (Ti cp). A investigação *in vitro* incluía a análise da morfologia, da estrutura química da superfície, da rugosidade e da estrutura cristalina da película de TiO_2 preparado. A investigação *in vivo* foi conduzida através da

colocação cirúrgica dos implantes anodizados em tíbia de coelhos em diferentes períodos de cicatrização. A análise histológica de rotina foi realizada para avaliar as reações do tecido do osso aos implantes anodizados. A anodização de implantes de titânio produziu alterações morfológicas, elevaram o percentual de oxigênio na camada de TiO_2 , aumentou a rugosidade da superfície dos implantes e notavelmente, modificou a cristalinidade do filme. Os autores concluíram que superfícies nanoestruturadas de implantes de titânio podem ser preparadas por oxidação anódica e promovem osseointegração acelerada, a qual pode ser recomendada para o carregamento inicial.

2.3.5 Estudos que compararam diferentes superfícies de implantes

Johansson e Albrektsson (1987) compararam implantes usinados a implantes recobertos por HA, e chegaram à conclusão de que os recobertos por HA apresentaram maior contato entre osso e implante.

Estudos *in vivo* através de modelos em animais revelaram que há aumento na deposição óssea em torno de implantes com superfície tratada através de jateamento seguido por ataque ácido quando comparados aos implantes lisos (Buser et al., 1991).

Pebé et al., (1997) demonstraram que, implantes com a superfície tratada por duplo ataque ácido (ácidos hidrocloreto e sulfúrico) apresentaram maior resistência à força de contra-torque do que implantes usinados ou jateados com partículas de alumina, tanto para os implantes que receberam carga por quatro meses como para os implantes que não receberam carga. Contudo, não houve diferença significativa no percentual de contato entre osso e implante entre as diferentes superfícies pesquisadas.

Carr et al., (1997) compararam por meio de cortes transversais, o percentual de contato entre osso e implantes recobertos por hidroxiapatita borrifada com plasma (HA-OS), implantes usinados de Ticp e implantes usinados em liga de Ti_6Al_4V instalados na mandíbula e maxila de babuínos e que não receberam carga. Os implantes recobertos por HA-PS apresentaram maior percentual de contato entre osso e implante do que os implantes usinados de Ticp e liga de titânio, após três meses de cicatrização.

Trisi et al., (1999) constataram que implantes com superfície jateada com partículas de Al_2O_3 instalados em osso tipo III em humanos, apresentaram maior percentual de contato entre osso e implante do que implantes usinados, após períodos de cicatrização de três, seis e doze meses, porém não houve alteração ou melhora da qualidade do tecido ósseo ao redor dos implantes com superfície tratada.

Cordioli et al., (2000), compararam quatro tipos diferentes de superfície de implantes (usinada, jateada com Al_2O_3 , tratadas com plasma de titânio (TPS), e atacada por ácido), verificaram que, dentro de um período de cinco semanas, os implantes com superfície tratada por ácido apresentaram 33% mais contato ósseo e foi necessário um torque 60% maior para sua remoção do que para os implantes com outras superfícies.

Ao compararem histomorfometricamente implantes de Ticp jateados com Al_2O_3 e anodizados termicamente, instalados em tíbia de coelhos, Kim et al., (2003) verificaram que, após quatro semanas, o percentual médio de contato entre osso e implante, para os implantes com superfície anodizada foi de 33,3%, e para os jateados 23,1%, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Tal diferença foi atribuída ao fato dos implantes anodizados apresentarem camada de óxido mais espessa o que aumenta a biocompatibilidade e a resistência á corrosão do Ti. Porém, após doze semanas, não houve diferença estatisticamente significativa no percentual médio de contato entre osso e os diferentes implantes.

Weng et al., (2003) realizaram uma pesquisa, na qual implantes com superfície modificada por TPS, por ataque ácido, e usinados, foram instalados em mandíbulas de cães. Demonstraram que os implantes com superfície tratada (TPS e ataque ácido), apresentaram maior superfície de contato entre osso e implante, em cortes longitudinais, do que os de superfície usinada, principalmente em áreas de baixa densidade óssea.

Ivanoff et al., (2003) constataram que implantes instalados tanto na maxila quanto na mandíbula de pacientes, cuja superfície foi tratada por oxidação anódica, apresentaram um maior contato com o tecido ósseo adjacente do que implantes com superfícies usinadas, após períodos de cicatrização médios de 6,6 meses para a maxila e 3,5 meses para a mandíbula.

Pinto e Elias (2006) demonstraram que a superfície dos implantes orais submetida à oxidação anódica revelou a presença de cálcio e fósforo na superfície, além da presença de titânio e oxigênio. Quando comparada a superfície usinada, houve diminuição da concentração de titânio e um aumento da concentração de oxigênio. Com estes resultados, os autores afirmaram que ocorreu aumento da espessura do óxido com incorporação de cálcio e fósforo na camada superficial. Na oxidação ocorre formação de gases, principalmente H₂ e O₂, que se condensam em microbolhas; desta forma, originaram poros que se interconectaram, justificando o aumento da rugosidade.

Histologicamente, foi observado que implantes com superfície tratada instalados na tíbia de coelhos apresentaram aumento no contato osso-implante (Celletti et al., 2006).

Alguns trabalhos demonstraram aumento na resposta óssea com a configuração nano+micro estruturas quando comparadas com micro apenas (sem nanoestruturas definidas), em humanos (Orsini et al., 2007; Goene et al., 2007) e ratos (Mendes et al., 2007).

Contudo, alguns autores, em um estudo com

acompanhamento de oito semanas em cachorro, obtiveram valores similares de contato osso-implante entre implantes micro comparados com micro+nano (Vignoleti et al., 2009).

O comportamento de células em cultura foi avaliado na presença de três superfícies de titânio: polidas, submetidas ao ataque ácido e superfície modificada em escala nanométrica com alumina. Os resultados revelaram mais expressão de genes envolvidos no metabolismo ósseo em superfícies de titânio com modificações nanométricas. E ainda, implantes com tal superfície apresentaram maiores valores de contato osso-implante e de torque de remoção em experimentos in vivo (Mendonça et al., 2009).

Busquim et al. (2012) realizaram um estudo com o objetivo de caracterizar a camada de TiO_2 existente em implantes comerciais Vulcano Actives (anodizado) e Master Porous (tratado com ácido) e comparar com o implante não comercial Porous Nano (deposição de íons). As amostras foram submetidas aos seguintes tratamentos de superfície e divididas em grupos: a) usinado com superfície semelhante ao implante comercial Master Screw; b) ataque com ácido semelhante ao implante comercial Master Porous; c) Anodizado semelhante aos implantes Master Vulcano Actives; d) Tratados com flúor, tratamento não comercial. Nas amostras sem tratamento observaram-se marcas de usinagem. Com o tratamento ácido, a superfície torna-se mais homogênea, as características morfológicas facilitam adsorção, adesão, espalhamento e diferenciação celular; o tempo para instalação de carga é menor que para os usinados. Os implantes com superfície atacada por ácido são indicados para colocação em osso menos denso e induzem sensível redução no tempo de cicatrização. Com o tratamento de anodização, resultados histológicos mostram que a superfície é indutora, há deposição de osso na superfície do implante simultaneamente com o crescimento ósseo a partir das paredes do alvéolo. Nas superfícies tratadas com fluoretos, é possível identificar alterações na morfologia em relação à superfície tratada com

ácido, tendo a presença de partículas nano e micrométricas depositadas na superfície do implante. Neste trabalho concluiu-se que as superfícies anodizadas apresentaram maiores valores de rugosidade. O ângulo de contato entre o líquido e a superfície foi, em todas as amostras, menor que 90° o que torna a superfície hidrofílica, permitindo melhor contato do coágulo com o implante. As superfícies anodizadas apresentaram molhabilidade significativamente superior às demais. Quanto ao torque de remoção, as superfícies usinadas foram mais facilmente removidas. A superfície Vulcano Actives foi submetida ao tratamento de oxidação anódica em solução eletrolítica contendo cálcio e fósforo, revelando a presença de cálcio, fósforo, titânio e oxigênio. É possível afirmar que essas mudanças podem ser atribuídas ao aumento da espessura do óxido com incorporação de cálcio e fósforo na camada superficial. O óxido formado na superfície das amostras anodizadas apresenta mistura de TiO_2 na forma de rutilo e anatase.

Choi et al., (2012) compararam a superfície bioativa modificada por fluoreto do implante Osseospeed (Astra Tech, Mölndal, Sweden) com a superfície bioinerte modificada por anodização Ti Unite (Nobel Biocare AB, Gothenburg, Sweden). Nove implantes teste cônicos e rosqueados, de 4 mm de diâmetro por 11 mm de altura foram tratados com fluoreto e jateados com partículas de TiO_2 . Os nove implantes controle utilizados possuíam conexão externa convencional, com diâmetro de 4 mm e altura de 11,5 mm, eram torneados e foram submetidos à oxidação anódica, o que tornou o implante poroso. A análise da superfície dos dois grupos foi feita com MEV, EDS e microscópio de laser confocal. Foram utilizados para o teste cinco coelhos machos, cada um recebeu dois implantes, um teste em uma tíbia e o controle em outra. Somente a resposta óssea ao redor do implante foi considerada. Após 2 semanas de cicatrização óssea, os coelhos foram sacrificados, os implantes removidos em bloco com um colar adjacente de osso, que foram preparados e analisados. Os resultados foram que o defeito em forma de fenda

circunferencial criado foi quase totalmente preenchido por osso novo num período de 2 semanas, para ambos os tipos de implantes. Na avaliação da área óssea e o contato osso-implante não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos. Neste estudo, a superfície bioativa F- modificada não foi superior à superfície bioinerte anodizada em termos de resposta óssea inicial. Mais estudos foram solicitados para determinar se os recém - introduzidos implantes com superfícies bioativas são melhores em termos de osseointegração do que as superfícies modificadas existentes.

Lavenus et al., (2012) verificaram as interações entre células-tronco mesenquimais humanas e a integração óssea de implantes de titânio nanoestruturado. Nanotexturas foram preparadas por anodização de Ti em uma mistura de ácido fluorídrico e ácido acético. As nanoestruturas 30 e 50 nm promoveram a expressão gênica precoce para a diferenciação dos osteoblastos a partir das células mesenquimais humanas, sem suplementos osteogênicos. A osseointegração de implantes de Ti nanoestruturado e do controle foi comparada pela implantação em tíbias de ratos no período de 1 e 3 semanas. As nanoestruturas aceleraram significativamente aposição óssea e força de ligação óssea *in vivo*, em correlação com os resultados *in vitro*. Os achados desta pesquisa demonstraram que as nanoestruturas específicas controlaram a diferenciação de células e, assim, a integração dos implantes. Sendo assim, concluíram que estas superfícies de titânio nanotexturizadas podem ser de grande interesse para implantes dentários e ortopédicos.

Para Zuo et al., (2013), há uma grande demanda por implantes dentários com a capacidade de acelerar a regeneração óssea perimplantar, sendo que as modificações de superfície micro e nanotopográficas revelaram afetar o metabolismo das células ósseas. Neste estudo, utilizou-se a alta tecnologia de barreira dielétrica (DBD) para modificar a superfície de Ti-cp. Em seguida, investigou-se a

citotoxicidade da superfície DBD-Ti quando comparadas com superfícies usinadas (Ti-m) e polido (Ti-p). Estes três tipos de placas de Ti exibiram diferentes energia superfície topografias nas escalas micro e nano. A superfície tratada com DBD Ti puro aumentou significativamente a adesão celular e proliferação das células MC3T3-E1 pré osteoblásticas, comparadas com as superfícies de Ti-m e Ti-p, sugerindo sua melhor biocompatibilidade em comparação às outras duas superfícies. Este estudo demonstrou que a modificação DBD reforça significativamente a adesão celular e a proliferação de pré-osteoblastos sem efeitos negativos sobre a diferenciação celular.

2.4 Histomorfometria

Histomorfometria (do grego *histós*-tecido; *morphe*-forma; *métron*-medida) é a análise quantitativa de estruturas histológicas, sendo que os parâmetros de avaliação podem variar; como área, perímetro e contorno (Vidigal Jr, 1996).

Os dois métodos mais empregados para analisar a interface entre osso e implante são os testes biomecânicos e análise histomorfométrica (Sykaras et al., 2000).

A análise histomorfométrica da interface entre osso e implante pode ser realizada por diferentes técnicas de observação (microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e microtomografia) e considerando diversos parâmetros, tais como: comprimento, diâmetro, formato, superfície e material do implante, modelo animal, tempo de implantação, sítio de implantação, aplicação ou não de carga funcional sobre os implantes analisados, período de cicatrização antes da aplicação da carga funcional, total da área analisada, orientação

dos cortes histológicos (Park et al., 2005).

2.4.1 Microtomografia Computadorizada (μ TC)

Em 1989 Feldkamp et al., Desenvolveram um método para examinar a estrutura de osso esponjoso utilizando a microtomografia computadorizada (μ TC) com a vantagem de ser uma técnica não destrutiva. A quantificação das estruturas ósseas foi baseada na análise histomorfométrica. Os parâmetros quantificados foram: razão entre volume ósseo e volume total da amostra (BV/TV); a razão entre a superfície óssea e seu volume (BS/BV); a separação média entre as trabéculas (Tb.Sp); a densidade das trabéculas (Tb.N) e a espessura média das trabéculas (Tb.Th). A reconstrução 3D permitiu uma descrição compreensiva da variação estrutural óssea.

De Assis em 1992 apresentou um sistema microtomográfico com características de um tomógrafo de primeira geração, com tubos de raios X convencionais e um sistema mecânico (translação e rotação), com precisão micrométrica. Foi usada uma amostra de dente decíduo para teste do sistema, e este conseguiu distinguir a camada de esmalte que recobre o dente e o diâmetro do canal central. A análise revelou que era possível identificar regiões de interesse com resolução de 20 μ m.

A μ TC é uma versão miniaturizada da Tomografia Computadorizada (TC) e vem sendo utilizada na área de pesquisas de materiais. Na área biológica, foi adaptada para o estudo de materiais duros como matriz óssea dentária (Davis, Wong, 1996).

A necessidade de se estudar estruturas cada vez menores, fez com que na década de 1980 surgisse a μ TC. Nesta técnica

o sistema tomográfico possui uma fonte de raios X com um foco bem menor do que os comumente usados em diagnóstico, da ordem de micrômetros. Uma vantagem desta técnica está na alta resolução espacial alcançada, permitindo uma maior magnificação da imagem, sem que haja o efeito indesejável da penumbra geométrica (Lopes et al., 1997).

De acordo com Muller et al. (1998) alterações morfológicas são tradicionalmente estudadas através de medidas feitas em duas dimensões, onde os parâmetros estruturais são inspecionados visualmente ou medidos de secções transversais das amostras. O método convencional de histomorfometria envolve uma cuidadosa preparação da amostra, seguido de secções das amostras em lâminas bem finas. Apesar de o método apresentar alta resolução espacial e alto contraste, consome muito tempo e necessita de um técnico treinado.

Segundo Rodrigues (2008), esta técnica é especialmente útil na visualização externa e interna da mesma parte do osso, sem provocar danos à amostra. Trata-se de uma técnica não destrutiva usada para criar um mapa tridimensional de pequenos campos com resolução de poucos micrômetros. As imagens obtidas podem ser submetidas ao uso de softwares específicos para análise e melhor compreensão dos dados, bem como para a construção de modelos computacionais 3D e simulações, utilizadas para os mais diversos fins.

2.4.1.1 Estudos com μ TC

Apesar de não haver ainda uma padronização, a histomorfometria por μ TC vem sendo frutos de muitos trabalhos em cima da estrutura trabecular dos ossos. A osteoporose é uma das principais doenças investigadas por esta técnica. Por ser uma doença caracterizada

por aumento na fragilidade óssea, alterações na região trabecular podem ser facilmente detectadas por μ TC, tendo em vista que a fragilidade óssea não está somente ligada à densidade mineral óssea, mas depende em grande parte da estrutura trabecular (Goulet et al., 1994).

Mercer e Anderson (1996) sugeriram um estudo piloto para investigar os efeitos do laser de dióxido de carbono no esmalte de dentes, para isto mediram as mudanças da densidade mineral nos dentes através dos níveis de cinza das imagens microtomográficas. Os resultados mostraram a habilidade da μ TC para exibir alta resolução das imagens bidimensionais, e quantificar mudanças em densidade mineral dentro das amostras.

Yang et al. (2003) avaliaram a influência da resolução espacial da μ TC de ossos de ratos. Os autores mostraram que, com uma resolução de 15 μ m era possível notar uma mudança estrutural nas amostras de tíbias entre os dois grupos de amostras estudados.

Postnov et al., (2003) desenvolveram um método para medir densidade do cálcio em amostras ósseas, utilizando a técnica de μ TC. As μ TC foram adquiridas de fêmures de ratos. Os autores empregaram uma correção polinomial para endurecimento do feixe. Os níveis de cinza foram calibrados com os valores da densidade mineral do cálcio. O conteúdo do cálcio foi calculado diretamente do histograma das imagens e expresso como percentual da relação do volume e peso das amostras ósseas.

Boyd et al., (2006) monitoraram a evolução de alterações em ratas ovariectomizadas *in vivo*. Foram utilizadas 20 fêmeas, todas com oito meses de vida. As μ TC foram realizadas na tíbia direita de cada rata, ocorrendo em intervalos de um mês durante seis meses. As ratas foram mantidas sedadas no momento de cada medida. As análises histomorfométricas mostraram que os animais ovariectomizados tiveram uma grande diminuição da fração de volume ósseo (BV/TV), sendo mais acentuada nos três primeiros meses (72%). Também foram notadas

alterações significativas em BS/BV, Tb.N, Tb.Sp, Th e ConnD. Este trabalho mostrou a possibilidade de realizar medidas histomorfométricas *in vivo* através de μ TC, com a vantagem de que cada animal possa ser seu próprio controle.

Nyman et al., (2009) comentaram sobre a carência de técnicas objetivas para analisar o reparo ósseo. Relataram que os testes biomecânicos são os testes quantitativos mais utilizados atualmente, mas constituem uma técnica destrutiva. Sugerem a μ TC como técnica adequada e não destrutiva para avaliar a estrutura e densidade ósseas. O objetivo do trabalho foi comparar as correlações entre características quantitativas do calo ósseo por μ TC e por teste biomecânico durante o tratamento com fraturas com lovastina em diferentes doses. Foi realizada uma fratura em fêmur dos ratos que receberam lovastina local. O sacrifício foi feito após 4 semanas. Foram realizadas análises por μ TC e teste de flexão em três pontos. Para a determinação da região de interesse do objeto (ROI), os autores localizaram uma linha de fratura e selecionaram cem *slices* acima e cem abaixo dessa linha. Os parâmetros utilizados foram: volume da amostra (TV), volume ósseo da amostra (BV), razão entre volume ósseo e volume da amostra (BV/TV) e densidade mineral óssea volumétrica do tecido mineralizado (BMD) dentro do calo ósseo. Para a obtenção dessas medidas, foi feito um contorno no perímetro de cada *slice* do calo ósseo. Com o objetivo de quantificar a conectividade da cortical do calo ósseo (ausência de lacunas e fendas), os autores fizeram um ROI menor que continha apenas uma fina região da cortical do calo e analisaram os mesmos parâmetros. Os autores observaram que o TV e o BV do calo foram inversamente proporcionais com a Rigidez e Força máxima, sugerindo que os maiores calos foram mais fracos que os calos menores. A densidade de tecido mineralizado no calo teve a mais forte correlação com a resistência do calo. A Força máxima e Rigidez aumentaram de acordo com BMD, indicando um aumento da resistência do calo. Na análise da cortical externa do calo ao

redor da fratura, BV/TV foi diretamente proporcional com a Força máxima e Rigidez do calo. Isto sugeriu que menor quantidade de fendas e lacunas na cortical do calo aumenta a resistência do mesmo.

3 DETALHAMENTO METODOLÓGICO

Este projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos/UNESP com protocolo 02/2014-PA/CEP e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Para este estudo foram utilizados 10 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, pesando cerca de 4,0 kg, com 5 meses de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP-Campus de Botucatu.

3.1 Implantes

Sessenta implantes Ti cp tipo IV, de 8,5mm x 3,75mm de diâmetro, com ápice cônico arredondado com quatro câmaras de corte, rosca auto perfurante, hexágono externo (HE), fornecidos pela empresa TITANIUM FIX (São José dos Campos, SP, Brasil); foram utilizados para o desenvolvimento deste estudo. Inicialmente, estes, foram divididos em três grupos:

- Grupo 1 LISO (Controle) : superfície usinada Ti cp tipo IV;
- Grupo 2 JATEADO (Comercial): superfície usinada submetida ao

jateamento com óxido de alumínio seguido de subtração por ácido nítrico;

- Grupo 3 ANODIZADO (Experimental): superfície usinada submetida ao processo de anodização com aplicação de corrente pulsátil (30 V, 0,6 A e 1000 Hz, durante 4 horas).

3.2 Procedimento de Anodização

Os implantes usinados (sem tratamento de superfície) foram devidamente adaptados em uma placa de titânio (Figura 3A) para posterior limpeza com álcool isopropílico em ultrassom por 10 minutos. Em seguida, foram novamente lavados água deionizada por mais 10 minutos em ultrassom (Figura 3B). Após este procedimento de lavagem, os implantes foram submetidos à secagem com ar frio.



Figura 3 - A) Implantes posicionados em placa de titânio, B) Implantes lavados em ultrassom.

Após estes procedimentos, iniciou-se o processo de anodização. Para isso, os implantes adaptados na placa de titânio foram devidamente colocados, juntamente com uma placa de cobre (para permitir passagem de corrente elétrica), tendo-se então um ânodo e um

cátodo, num Becker contendo 1 mol/L de H_2SO_4 utilizado como meio eletrolítico (Figura 4).



Figura 4- Implantes na placa de titânio e placa de cobre inseridos no Becker com solução de 1 mol/L de H_2SO_4 .

Os parâmetros utilizados para a anodização foram aplicação de corrente pulsátil (30% de ciclo de trabalho, 30 V, 0,2 A e 1000 Hz, durante 4 horas). Para o monitoramento dos parâmetros elétricos nesta condição, foram utilizados: um osciloscópio digital, modelo MO2061, marca Minipa; um retificador pulsante de onda quadrada, modelo GI21P-10/30, da empresa General Inverter (Figura 5).

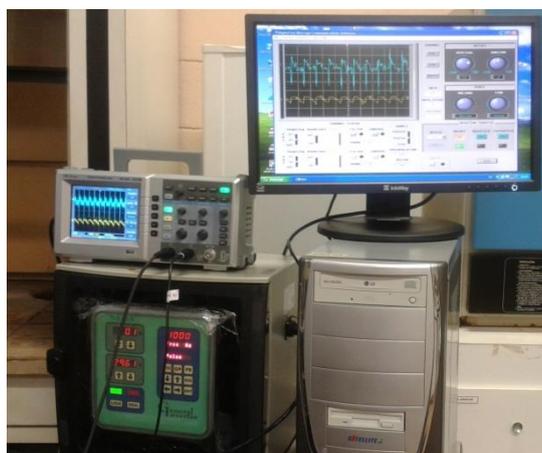


Figura 5- monitoramento dos parâmetros elétricos: um osciloscópio digital (MO2061); e retificador pulsante de onda quadrada (GI21P-10/30).

Após a anodização, os implantes apresentaram coloração azulada (Figura 6).



Figura 6- Figura demonstrativa: implante inicialmente usinado (sem tratamento) (A), e submetido à anodização, exibindo coloração azulada (B).

3.3 Caracterização dos Implantes

Os implantes foram analisados previamente à instalação cirúrgica, e após a remoção por torque reverso, a fim de observar se houve dano na superfície e composição química após a instalação cirúrgica e posterior remoção dos mesmos com o torquímetro digital.

Os implantes de superfície anodizada foram analisados por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM) para caracterização da morfologia da superfície.

A análise de Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no Laboratório de Caracterização Estrutural DEMa / UFSCar por meio do equipamento Philips XL-30 FEG, com aumento de 100.000 e 200.000 vezes.

A análise de AFM foi realizada no Laboratório Associado de Sensores e Materiais – LAS, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

– INPE, utilizando um microscópio de força atômica V Nanoscope Veeco. Durante a análise, o microscópio foi operado no modo de contato sendo utilizado um cantilever V shape Si_3N_4 . Em tal modo operacional, o sistema de resposta do microscópio foi regulado para manter a distância entre a ponta do microscópio e às superfícies, constante durante a varredura da amostra, e o movimento z realizado pelo piezoelétrico cerâmico foi registrado durante a digitalização. Esta técnica de microscopia consiste em monitorar a força entre uma ponta de prova e a superfície da amostra. Assim, preserva-se a superfície e a qualidade dos resultados.

Para a caracterização química, foram realizadas as análises de e Espectroscopia Raman, EDS e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para avaliar potencial de corrosão metálica.

Na Espectroscopia, foi utilizado o Espectrômetro Raman Horiba Scientific T64000, visando encontrar as bandas características da fase de anatase, sendo esta a fase mais cristalina e, portanto, a mais biocompatível, do TiO_2 .

Na análise por EDS, foi utilizado detector de energia dispersiva de raios X (EDS), juntamente com o programa Spirit 1.9 (Bruker), que realizou a análise dos elementos químicos presentes e sua quantificação. Por meio deste equipamento foi observada a composição química de cada material estudado.

Na técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), que consiste na aplicação de um potencial elétrico variável, utilizou-se um potenciostato/galvanostato Autolab (Eco. Chemie B. V., Utrecht, Netherlands), modelo PGSTAT302N. A coleta e análise dos dados foi feita utilizando o programa NOVA 1.8 em uma célula eletroquímica e a medição da resposta, na forma de corrente elétrica, desta célula a esta excitação.

3.4 Procedimentos Cirúrgicos

Previamente à cirurgia de instalação dos implantes, os mesmos foram devidamente lavados em ultrassom e esterilizados com 25 kGy na empresa EMBRARAD (Unidade de Esterilização Cotia LTDA, Cotia – SP – Brasil. CNPJ: 45.789.724/0002-85 – I.E.: 278.015.211.114).

As cirurgias foram realizadas em sala cuidadosamente limpa, com álcool etílico na concentração de 70%; com instrumentos devidamente esterelizados. O cirurgião e auxiliares utilizaram aventais esterelizados, e materiais descartáveis (máscaras, luvas estéreis, gorro).

3.5 Anestesia

Previamente à cirurgia de implantação, os animais foram pesados e anestesiados por via intramuscular, com uma mistura de 13 mg/kg de solução aquosa a 2,3 g de cloridrato de xilazina (Anasedan – Vetbrands), substância sedativa analgésica e relaxante muscular, com 33 mg/Kg de quetamina (Dopalen - Agibrands do Brasil Ltda.) como anestésico geral; e anestésico local composto por cloridrato de prilocaína 3% associado à felipressina 0,03 UI/mL (Citanest a 3%[®] – Dentsply).

3.6 Instalação dos implantes

Após antissepsia e anestesia dos coelhos a cirurgia para instalação dos implantes teve início. Os locais cirúrgicos das tíbias direita

e esquerda foram submetidos à raspagem e à anti-sepsia com solução de álcool iodado. A incisão foi realizada com lâmina de bisturi número 15 na região correspondente à face medial da tíbia em seu terço proximal. A cortical da tíbia foi exposta e as lojas cirúrgicas então realizadas. Durante todo este procedimento foi mantida irrigação abundante com cloreto de sódio a 0,9%, visando evitar o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso.

Em seguida, a perfuração para instalação dos implantes foi realizada com a sequência padronizada de brocas para implantes de diâmetro 3,75 x altura 8,5 mm. Os implantes foram instalados manualmente até a obtenção da estabilidade primária e então, adaptaram-se os parafusos de cobertura. Os coelhos foram submetidos à cirurgia de instalação de seis implantes, três em cada tíbia, sendo um de cada grupo em cada tíbia (Figura 7).

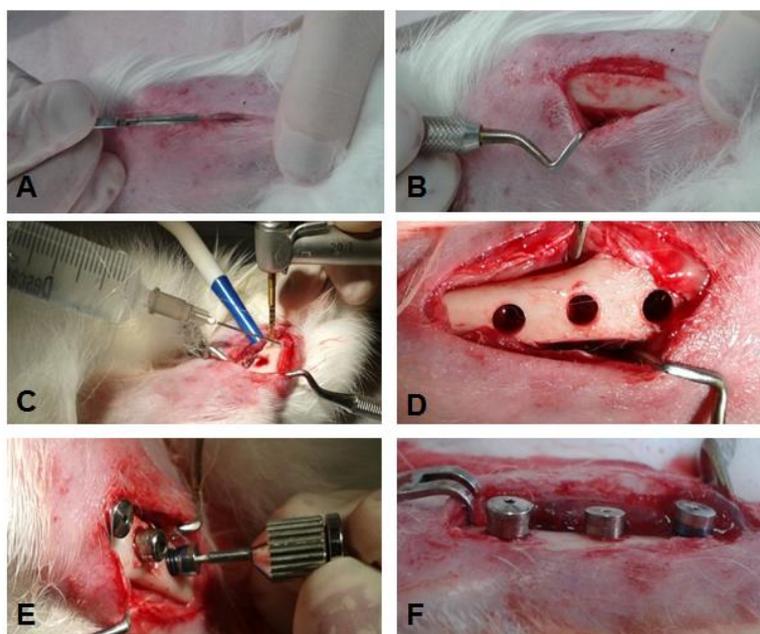


Figura 7 - Sequência cirúrgica: A) Incisão com lâmina de bisturi 15; B) Exposição da cortical óssea; C) Confeção das lojas cirúrgicas com brocas padronizadas e irrigação constante com cloreto de sódio a 0,9%; D) Lojas cirúrgicas; E) Instalação dos implantes; F) Implantes instalados e parafusos de cobertura adaptados.

Após o procedimento cirúrgico de colocação dos implantes, o tecido muscular foi suturado com fio absorvível nº4 (Monoglyde ® Poliglecarpone 25), a pele suturada com fio de seda nº4 (Ethicon/Johnson & Johnson) e novamente foi realizada anti-sepsia com álcool iodado. Os animais receberam terapia antibiótica com benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica e diidroestreptomicina base sulfato em ampola de 6.000.000 UI (Pentabiótico – Fort Dodge), por via intramuscular na dose de 1,35 mL/kg, no pós-operatório imediato. Após a cirurgia, os coelhos foram colocados em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum*, e monitorados até o prazo da eutanásia de 2 e 6 semanas. Cada período de sacrifício foi composto de um grupo de 5 coelhos.

3.7 Eutanásia

Para a eutanásia os animais foram submetidos à anestesia geral profunda (propofol 10 mg/Kg) via intravenosa e em seguida foram submetidos à administração de uma ampola de cloreto de potássio via intravenosa para sacrifício.

As tíbias direitas contendo os implantes foram armazenadas em formol tamponado para serem utilizados para avaliação de RP e μ TC.

As tíbias esquerdas contendo os implantes foram armazenadas em solução de Ringer em congelador a – 20 °C, uma vez que esta solução mantém as condições mais próximas às do sangue; para posterior teste por remoção de torque. Após a realização deste, foi efetuado o teste de citotoxicidade por MTT.

3.8 Análise por Radiografia periapical (RP)

Ao período de eutanásia (2 e 6 semanas), as tíbias direitas dos coelhos contendo os implantes, foram submetidas à radiografia periapical (RP), visando observar a presença de tecido ósseo neoformado (imagem radiopaca) e a ausência de halo radiolúcido, o qual indicaria a formação de tecido fibroso ao redor dos implantes.

Para obtenção das imagens radiográficas periapicais foi utilizado o aparelho de raios X odontológico convencional da marca Dabi Atlante, modelo Spectro 70 X Seletronic e realizada a técnica do paralelismo com 70 kV e 8 mA com um tempo de exposição de 0,4 segundos. O filme utilizado foi o Ekataspeed Plus (EP-21p) fabricado pela Eastman Kodak Company mantido pelo posicionador (Posicionador RH para incidências radiográficas– Indusbello® – Ind. de Instrumentos Odontológicos Ltda – Manual).

Para realização da técnica radiográfica, as tíbias foram adequadamente imobilizadas em uma mesa apropriada e posicionadas de forma que o filme ficasse paralelo à região de interesse e que a incidência dos raios X fosse perpendicular aos implantes (Figura 8).



Figura 8 - Tibia posicionada para realização do exame radiográfico periapical.

O processamento radiográfico foi pelo método tempo-temperatura, com soluções novas. Em seguida, as RP foram digitalizadas e avaliadas pelo programa Image J® versão 1.29x: NIH, Bethesda, MD, EUA para quantificação densitométrica. Neste programa as imagens foram convertidas para uma escala de 8 bits com ajustes de brilho e contraste. As imagens de cada implante foram recortadas e transformadas em arquivos separados e armazenadas no formato TIF.

Em cada imagem, a área de interesse selecionada foi a região entre as roscas dos implantes (lados direito e esquerdo da imagem radiográfica), exceto as duas últimas roscas, pois algumas imagens não apresentavam definição adequada (Figura 9). Após a seleção da área de interesse, foi realizado o histograma de cada implante, para cada grupo estudado (liso, jateado e anodizado). Ao clicar, este programa fornece os valores de escala de cinza. Este histograma mostra os dados sobre a quantificação densitométrica com as médias dos valores dos pixels na escala de cinza entre 0-255, atribuindo valor zero para o nível mais escuro de cinza (preto) e 255 para o mais claro (branco). Deste modo, valores mais próximos do branco indicaram melhor osseointegração.

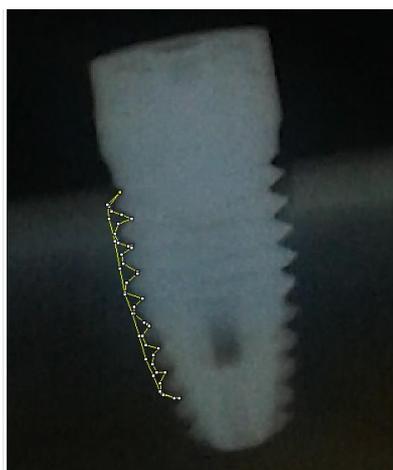


Figura 9- área de interesse selecionada entre as roscas dos implantes em implante anodizado no período de 2 semanas.

3.9 Avaliação por Microtomografia Computadorizada (μ TC)

As tíbias contendo os implantes foram avaliadas através do microtomógrafo de raios X SkyScan 1176 – Bélgica (Figura 10). A captação dos dados desta análise foi realizada na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP sob a responsabilidade do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia. Os parâmetros para reconstrução da imagem em μ CT foi o escaneamento com rotação das peças em 360°, utilizando raios X monocromáticos com 89 kV e 275 μ A, filtro de cobre 0.1. A reconstrução das imagens utilizou os softwares NRecon, Dataviewer (fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo SkyScan 1176 - Bélgica) e para quantificação da formação óssea foram utilizados os softwares CT-Analyzer e CT-Vol.

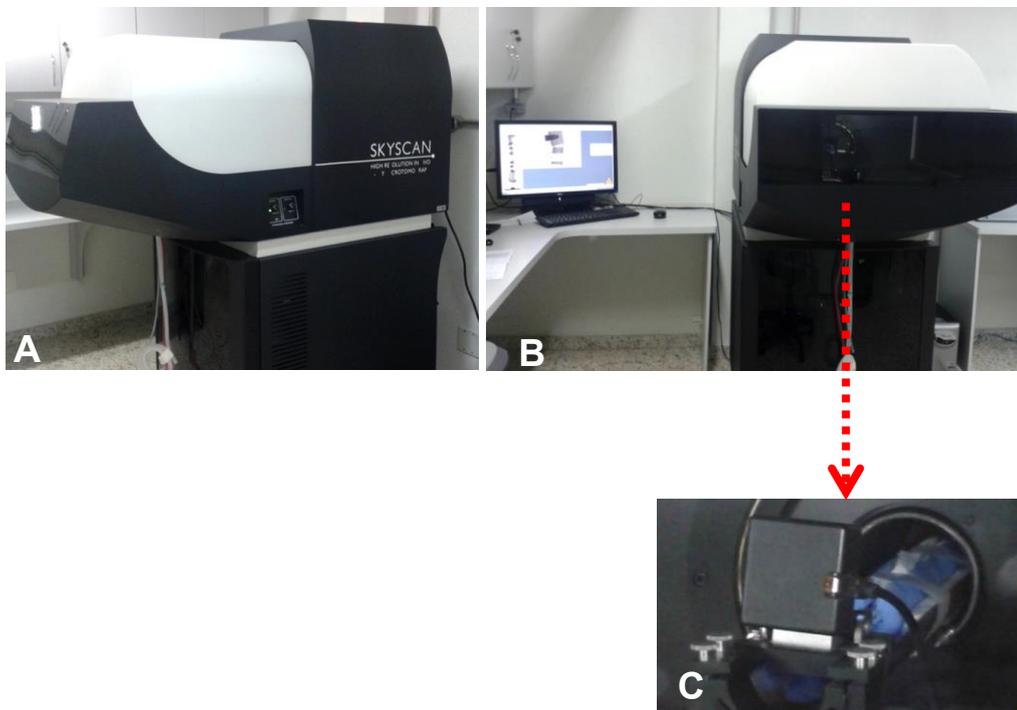


Figura 10 – A) e B) Microtomógrafo de raios X SkyScan 1176 (Bélgica). C) Tíbia devidamente posicionada no isopor azul no interior do microtomógrafo para análise.

Após o escaneamento das tíbias, as imagens dos cortes foram reconstruídas individualmente pelo programa NRecon da Skycan, obtendo-se os cortes como ilustrado na Figura 11.

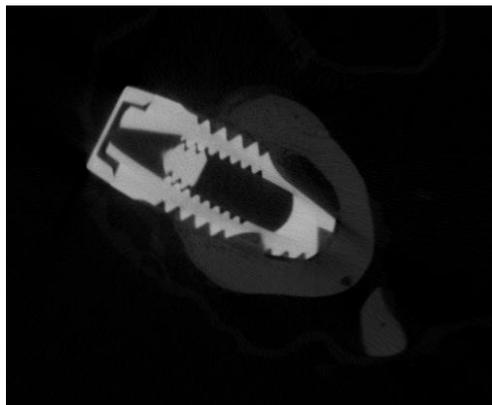


Figura 11 - Imagem reconstruída de microtomografia computadorizada de implante anodizado no período de 6 semanas.

Para alinhamento das imagens e escolha do plano a ser avaliado utilizou-se o programa Data Viewer da Skycan, (Figura 9). Após a visualização no programa Dataviewer, nas vistas coronal, transversal e sagital (Figura 12), foi criado um *dataset* a partir da vista transversal para realizar a análise da neoformação óssea.

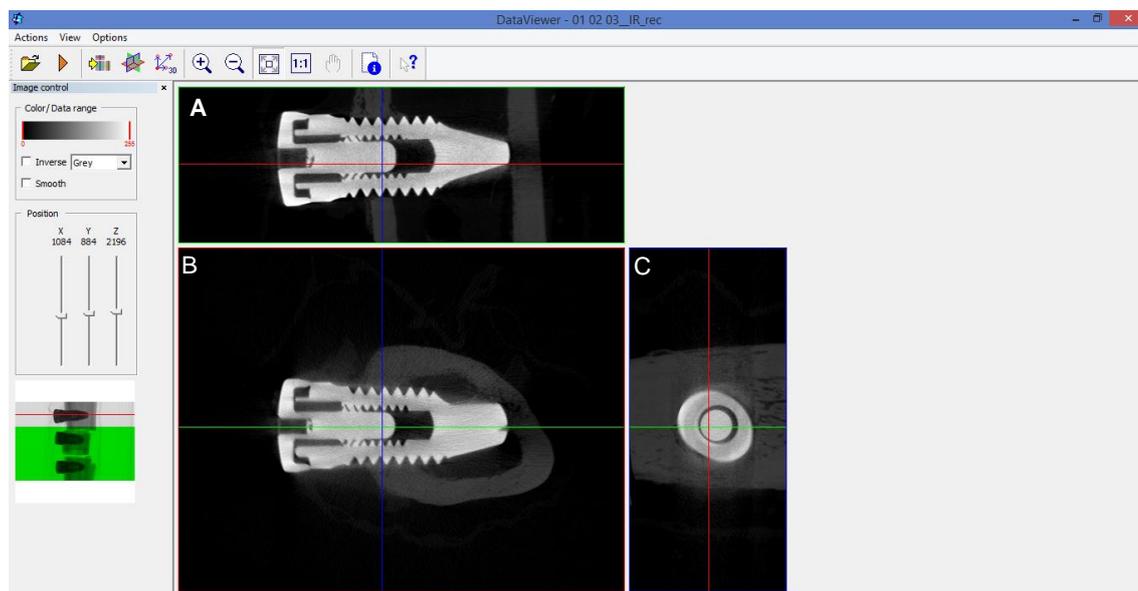


Figura 12 - Utilização do programa *Data Viewer*, centralização as linhas na região cortical nos planos: coronal (A), transversal (B) e sagital (C).

Neste estudo foi escolhido o plano transversal para ser realizada a análise de quantificação da neoformação óssea na interface osso/implante. No programa *CT Analyzer da Bruker MicroCT (CTAn)*, na vista transversal, foi feita a seleção da região de interesse (ROI) retangular, na região de osso cortical, delimitada da mesma forma para todos os grupos (Figura 13). Ainda no programa CTAn foi criado um volume de interesse (VOI), a partir do ROI determinado. Foram utilizados 100 cortes (slices) da tíbia para compor o VOI. Foi escolhido este valor, por ser o número de cortes (slices) máximo em que o VOI não ultrapassaria o osso cortical pré-existente, o que poderia alterar os resultados do estudo.

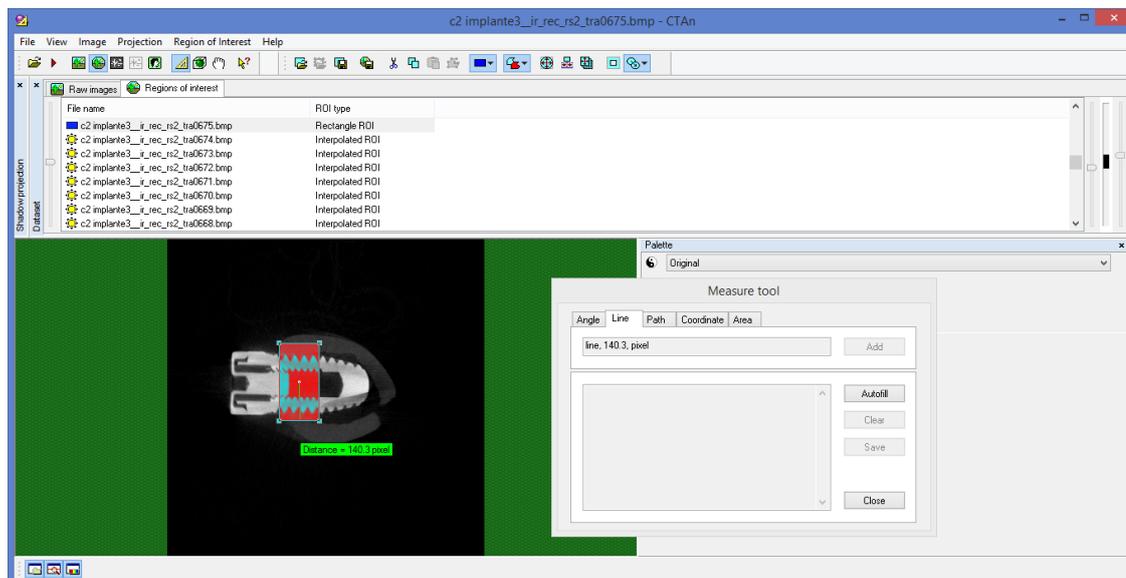


Figura 13 - Seleção do ROI (área a ser analisada) no plano transversal, G3 (anodizado) período de 2 semanas.

Para ser realizada a análise 3D, para cada fragmento ósseo contendo um implante, foi ajustado um histograma para diferenciar o implante do osso de acordo com a densidade de cada material (Figura 14 e Figura 15).

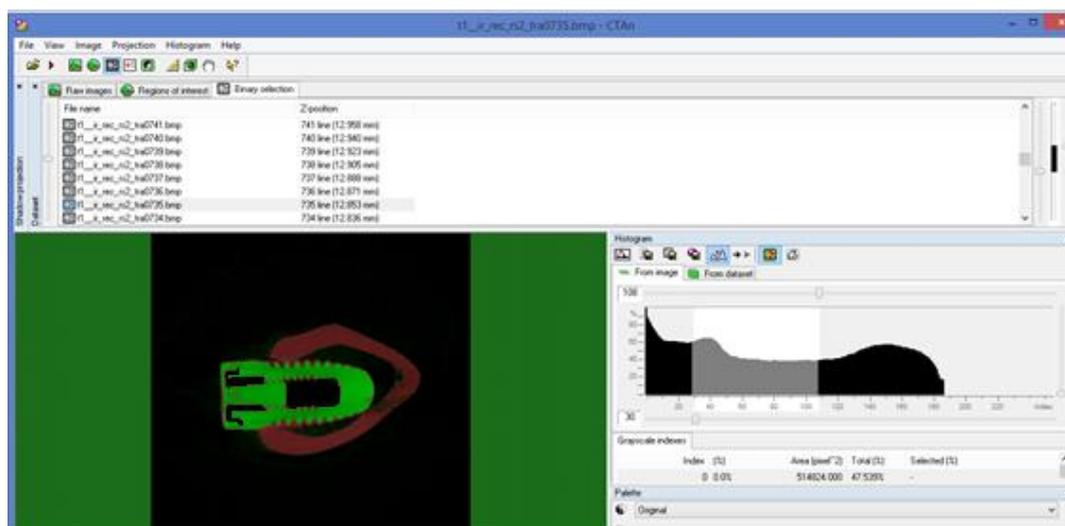


Figura 14 - Ajuste do histograma: observar o crescimento ósseo na interface osso/implante. As áreas em verde representam o implante, as áreas em vermelho representam a neoformação óssea dentro das roscas e o osso cortical pré-existente.

Foram avaliados os parâmetros de volume ósseo (BV), espessura de trabéculas (Tb.Th) e a proporção entre volume ósseo e volume trabecular (BV/TV).

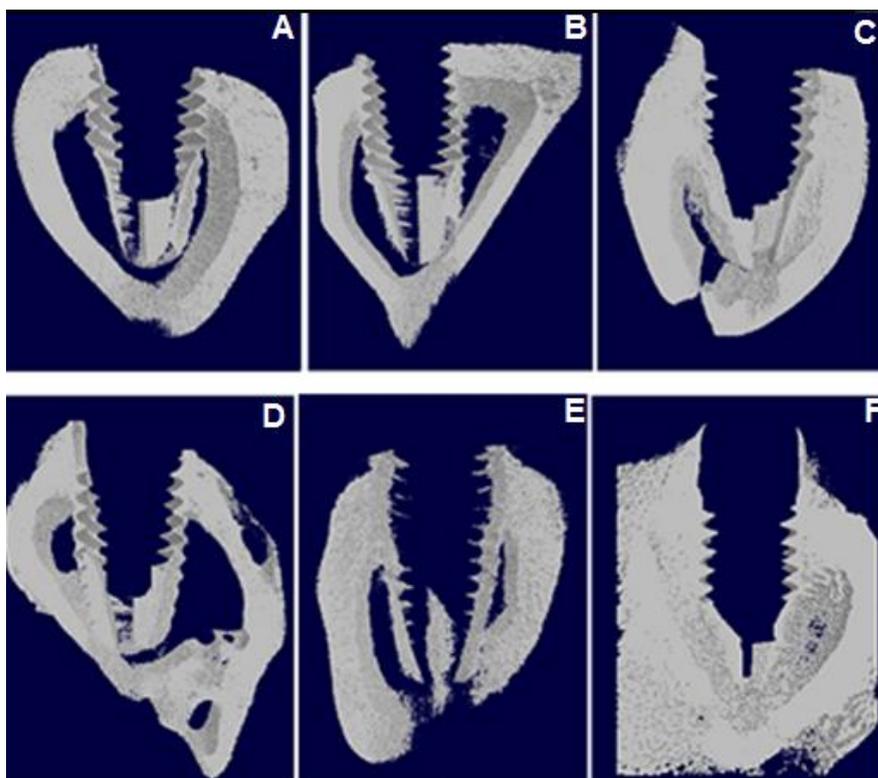


Figura 15 – Visualização 3D do VOI (volume de interesse) a partir do *software* CT-Vol. Imagem sem o implante (região central), podendo ser observado o tecido ósseo a partir do ROI selecionado: A) Implante Usinado (G1) no período de 2 semanas; B) Implante Rugoso (G2) no período de 2 semanas; C) Implante Anodizado (G3) no período de 2 semanas; D) Implante Usinado (G1) no período de 6 semanas; E) Implante Rugoso (G2) no período de 6 semanas; F) Implante Anodizado (G3) no período de 6 semanas. Visualmente observa-se maior quantidade de osso cortical para os implantes do Grupo 3, tanto no período de 2 semanas como no de 6 semanas; em comparação aos demais implantes.

3.10 Teste por remoção de torque

Após o sacrifício dos animais, as tíbias esquerdas foram

imobilizadas em uma morsa, os implantes expostos e submetidos ao teste de torque reverso usando um torquímetro digital (Mark-10 corporation, USA) (Figura 16). A força necessária para deslocar os implantes inseridos nos cinco coelhos do período de sacrifício de 2 e 6 semanas, foi medida e os valores registrados foram aqueles referentes ao torque máximo para a remoção do implante, o qual promoveu a fratura da interface osso-implante.

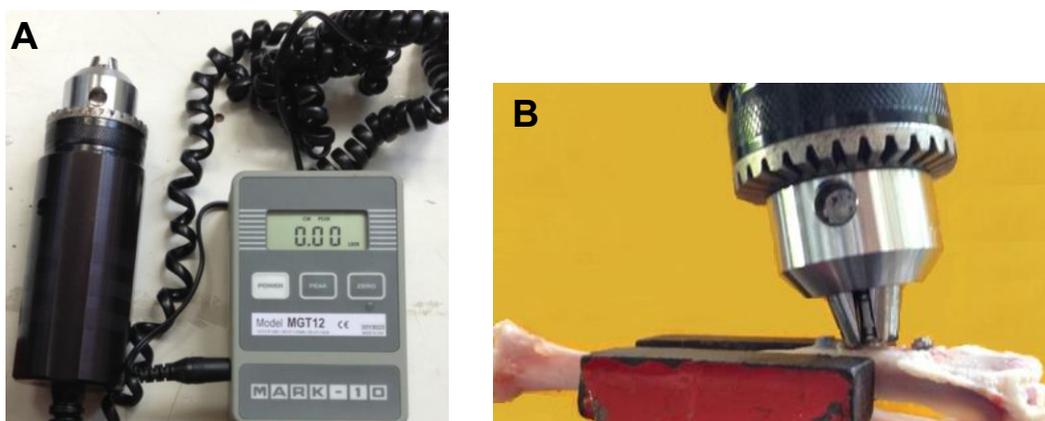


Figura 16 – A) Torquímetro digital (Mark-10 corporation, USA). B) Remoção de implante da tíbia posicionada e imobilizada na morsa.

3.11 Avaliação da citotoxicidade por MTT

3.11.1 Procedimento de cultura de células

Para a etapa *in vitro* deste estudo, foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*), machos, recém-nascidos (2 a 4 dias). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade “Júlio de Mesquita Filho” UNESP Campus de Botucatu.

3.11.2 Isolamento de células da linhagem osteoblástica e desenvolvimento de cultura primária osteogênica

Células osteogênicas foram isoladas por digestão enzimática sequencial de fragmentos de calvária de ratos Wistar recém-nascidos (2 a 4 dias), com solução de tripsina a 0,25% (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e colagenase tipo II a 0,1% (Gibco, Invitrogen), como descrito por Williamson et al., (2013). As células foram plaqueadas sobre os implantes contidos em placas de poliestireno de 24 poços, na densidade de 2×10^4 células/poço. As células plaqueadas foram cultivadas por períodos de até 14 dias em meio essencial mínimo, modificação alfa, com L-glutamina (α -MEM, Gibco, Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen), 7 mM de beta-glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma) e 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco, Invitrogen), à temperatura de 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscopia de fase em culturas crescidas sobre poços de poliestireno sem os implantes.

3.11.3 Determinação da viabilidade celular (ensaio de citotoxicidade)

O método é baseado na avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico ou experimental pela incubação com o corante MTT [(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol)] (Sigma). O MTT é um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis, produzindo um produto formazan solúvel no meio de cultura, e então, efetua-se uma análise espectrofotométrica do corante incorporado, o qual é diretamente

proporcional ao número de células vivas na cultura. No teste de citotoxicidade, foi utilizado como controle positivo solução de fenol a 0,2%.

Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas em dois períodos: 3 e 10 dias. Alíquotas de MTT a 5 mg/mL em PBS (tampão fosfato-salino) foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas primárias com esta solução a 10% em meio de cultura por 4 horas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1 mL de PBS aquecido a 37°C. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol e 134 µL de HCl) em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570 nm).

3.12 Análise Estatística

Para a avaliação dos dados obtidos da análise histomorfométrica, foi utilizado o programa computacional STATISTIC (versão 5.5, StatSoft Inc., 2000). A estatística descritiva (média e desvio-padrão) e a inferencial, mediante o teste paramétrico ANOVA e quando necessário ao teste de comparação múltipla de Tukey foram realizadas com nível de significância convencional 5%.

4 ARTIGO

4.1 Effect on osseointegration of a new method of nano-texturing implant surface by Anodization

Effect on osseointegration of a new method of nano-texturing implant surface by Anodization

Maria Fernanda Lima Villaça-Carvalho ^I; Mari Eli Leonelli de Moraes ^I; Luana Marotta Reis de Vasconcellos ^I; Heloisa Andrea Acciari ^{II}; Eduardo Norberto Codaro ^{II}; Natal Nerímio Regone ^{III}; João Paulo Barros Machado ^{IV}.

I Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista, State University of São Paulo (UNESP). Engenheiro Francisco José Longo Avenue, 777, São José dos Campos 12245-000, SP, Brazil. ZIP code 12245000. Department of Bioscience and Oral Diagnosis.

II Paulista State University Julio de Mesquita Filho, Faculty of Engineering of Guaratinguetá. Ariberto Dr. Pereira da Cunha Avenue, 333. Portal das Colinas ZIP code 12516410, Guaratingueta, SP-Brazil.

III Paulista State University Julio de Mesquita Filho, São João da Boa Vista Campus. Doutor Octávio da Silva Bastos Avenue – 2439. Jardim Nova São João ZIP code 13874149 - São João da Boa Vista, SP – Brasil.

IV National Institute for Space Research, INPE. Associated Laboratory of Sensors and Materials. Astronauts Avenue, 1758, Jd. Granja
(12) 3208-6000

ABSTRACT

Objective: Obtain nanotopography and anatase phase, by anodization in dental implants; by the anodization; seeking for the optimization of the osseointegration. Materials and Methods: Sixty implants were divided into: Group 1 (control); Group 2 (sandblasted); Group 3 (anodized-experimental): anodized pulsed current (30% duty cycle, 30 V, 0.6 A and 1, 000 Hz). Ten rabbits received one implant of each group into the two tibia bones, and five rabbits were euthanized, 2 and 6 weeks after surgery. Prior to surgery, the surfaces were characterized by Atomic Force Microscopy (AFM), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) and Raman Spectroscopy. The implants of the right tibia underwent Periapical Radiograph (RP) and Computed Microtomography (μ TC); while the ones on the left tibia were submitted to reverse torque test and subsequent MTT cytotoxicity assay. Results: AFM and SEM showed the presence of nanotopography on the surface in G3; anatase and increase of TiO_2 layer were observed by means of Raman spectroscopy and EDS analysis. In RP, no implant presented radiolucent halo. In μ TC, G3 has always been superior than the other groups in the observed parameters: Bone Volume (BV), trabecular thickness (Tb.Th) and ratio of bone volume and trabecular volume (BV / TV). In reverse torque test, G3 exhibited greater clamping force to the bone tissue. In MTT test, G3 showed no cellular cytotoxicity. Conclusion: Anodizing used in this study positively affected the chemical and structural composition of TiO_2 film, enhancing its biological characteristics in osseointegration.

Clinical Relevance: Implants subjected to anodizing procedure with the

methods that were used in the experiment allow us to obtain the nanotexture and also the anatase phase, resulting in an increase of the bone formation at the interface of anodized implants, improving the osseointegration; without exhibiting cytotoxicity, making this surface a promising experimental implant to be used at the Dental Clinic of Implantology.

Key words: Anodizing, Microtomography, Nanotechnology, Osseointegration.

INTRODUCTION

In order to accelerate the osseointegration process nowadays, there has been a great concern about the topography of the surface of all of the implants [1, 2,3]. The evaluation of the cell-substrate interface is crucial for the performance of a successful implantation [4]. Several authors have observed that implants surface modifications may be able to improve the speed and quality of osseointegration resulting in increased bone deposition and also a reduction of the repair period [1-10]. These modifications display nanostructure features that can enhance the growth and attachment of mesenchymal cells and osteoblast due to an increased surface area and also provide better conditions for the cell-substrate interaction [4, 10-14]. Moreover, according to Yao et al., (2008) [15], the nano-sized features can simulate the cellular environment.

The interest in obtaining the nanotopography through the anodizing process has been increasing, since this technique exhibits adequate surface modification, which exhibits positive effect on cellular activities [10, 11, 16-19] and is a process of low cost and efficient reproducibility [20]. The anodization process creates nano-roughness on the implant surface and in addition, promote the formation of a more

crystalline TiO_2 film, favoring the growth of osteoblastic cells in different orientations, resulting in a more effective osseointegration process [10, 16-19, 21]. Yamagami et al., (2014) [22] showed that in dental applications, the contact between the metal implant and the living tissue of the surgical cavity is obtained by means of the oxide layer of the implant surface, allowing the osseointegration process.

The search for a relatively thick and uniform oxide layer than that formed naturally in the atmosphere, which allows metals to be more resistant against corrosion and abrasion, and also that brings benefits to the osseointegration has been a current challenge [23-25]. Studies show adhesion and cell orientation, as well as, a much faster osseointegration of these modified surfaces [1, 26, 27]. The crystal structure of TiO_2 obtained by anodization can significantly affect the performance of the implant as biomaterial, once the transformation of its amorphous form into crystalline oxide layer happens for many times [28]. There are three known crystalline forms of TiO_2 : brookite, rutile and anatase. Rutile is the thermodynamically more stable form, commonly used as a white pigment in paints and cosmetics; anatase is more crystalline form and biocompatible, obtained at lower temperatures and used in many fields of application, including medical applications; and brookite, is the intermediate stage of crystallinity [20].

Shokuhfar et al., (2014) [4] analyzed the interaction of osteoblasts in cpTi and $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ alloy exhibiting amorphous and crystalline titanium dioxide. The crystallinity of the film was shown by anatase phase, which was obtained by the anodizing process. This research has shown that the chemical composition of the substrate was more important in order to increase the cell density than the surface morphology. The authors concluded that the high wettability of the surface due to the crystallinity exhibited greater influence on cell spreading due to the hydrophilicity of the crystalline surface compared to amorphous one. A hydrophilic surface shows a higher protein adsorption to a hydrophobic

surface, promoting a positive effect on cell behavior in comparison to a hydrophobic surface.

The nano textured surfaces for stabilizing the titanium oxide layer, attracting more osteoblastic cells and promoting a more rapid bone formation [12, 16, 23, 24, 27, 29]. Kim K et al., (2013) [30] concluded that the anodized group had a titanium dioxide layer of TiO₂ thicker on its surface, resulting in improved corrosion resistance and also a significantly increase of the alkaline phosphatase activity.

In our study, the objective was to connect the morphology of nano roughness to the most crystalline chemical and biocompatible phase of TiO₂ (anatase), through the anodizing process. Thus, it was compared bone formation, osseointegration and *in vitro* cytotoxicity of machined cpTi implant, roughened implant (commercially available), and finally, trial implant subjected to anodizing process.

MATERIAL AND METHOD

This project was submitted and then approved by the Ethics in Researches Committee of the University of Dentistry of São José dos Campos in the State of São Paulo – UNESP, under the authorization protocol number 02/2014-PA / CEP and it was totally performed following to what is stated on the Ethical Principles for Animal Experimentation of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

For this study, 10 albino rabbits of New Zealand breed needed to be used, weighing about 4 kilograms each, being 5 months old in average, which were provided by the Central Animal Laboratory of the Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", UNESP, located at the Campus of Botucatu.

Implants

Sixty implants TITANIUMFIX brand, cp Ti type IV, measuring

8.5mm x 3.75 mm in diameter, with rounded conical apex with four cutting chambers, self-drilling screw, external hexagon (HE) were used and divided into three groups:

- Group 1 SMOOTH (Control): machined surface.
- Group 2 SANDBLASTED (Commercial) machined surface subjected to blasting with aluminum oxide followed by subtraction by nitric acid.
- Group 3 ANODIZED (Experimental): machined surface subjected to the anodizing process with application of pulsed current (30% duty cycle, 30 V, 0.6 A and 1000 Hz, for 4 hours).

Anodizing Procedure

The machined implants (without surface treatment) have been properly adapted into a titanium plate. After cleaning the surface, the implants were anodized. For this procedure, the implants which were adapted into the titanium plate were placed in Becker which contained 1 mol / L H_2SO_4 used as the electrolytic solution, with a copper plate (in order to allow the passage of electric current).

The application of pulsed current were the parameters used for the anodization were 30% duty cycle, 30 V, 0.2 A and 1000 Hz, 4 hours. For the monitoring of electrical parameters under this condition, there were used: a digital oscilloscope, model MO2061, Minipa brand; a pulsating square wave rectifier, GI21P-10/30 model, of the company General Inverter.

Characteristics of implants

The implants were analyzed prior to surgical installation, and after their removal by reverse torque, in order to observe any surface damage and alteration of their chemical composition.

The implants were analyzed by Scanning Electron Microscope

(SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM) to characterize the surface morphology. The scanning electron microscopy analysis was performed on Structural Characterization Laboratory DEMa / UFSCar through Philips XL-30 FEG equipment. The AFM analysis was performed in the Associated Laboratory of Sensors and Materials - LAS, National Institute for Space Research - INPE, using an atomic force microscope Veeco V Nanoscope.

In order to work on the chemical characterization, some analyzes on Raman spectroscopy were performed, as well as EDS and also the electrochemical impedance spectroscopy (EIS), being able to evaluate the potential for metal corrosion. In spectroscopy, Raman Spectrometer Horiba Scientific T64000 was used, aiming to find the characteristic bands of anatase phase, which is the most crystalline phase, and therefore, the most biocompatible one, TiO_2 . In the analysis by EDS, the spectrometry energy dispersive X ray detector (EDS) was used, as well as the program Espirit 1.9 (Bruker), for the analysis of chemical elements and their quantification. By using this device, it was possible to observe the chemical composition of each one of the researched materials. In the technique of electrochemical impedance spectroscopy (EIS), which consists in applying a variable electrical potential used a potentiostat / galvanostat Autolab of PGSTAT302N model (Eco. Chemie BV, Utrecht, Netherlands). The collection and analysis of data were made, using the NOVA program 1.8., in an electrochemical cell and also the measurement of the response in the form of electric current of this cell to this procedure.

Surgical Procedures

Prior to the implant placement surgery, they were properly washed in ultrasound and sterilized with 25 kGy in Embrarad company (Sterilization Unit LTDA, Cotia - SP - Brazil - Federal Tax Identification Number: 45789724 / 0002-85 – State Registration Identification Number

278 015. 211 114).

The surgeries were performed into a carefully cleaned room, with the use of ethanol at a concentration of 70%; and also with the use of properly sterilized instruments. The surgeon and assistants used sterilized aprons and disposable materials (masks, sterile gloves).

Anesthesia

Prior to the implantation surgery, the animals were weighed and anesthetized intramuscularly with a mixture of 13 mg/kg of aqueous solution of 2, 3g of xylazine hydrochloride (Anasedan - Vetbrands), analgesic and muscle relaxing sedative substances, with 33 mg/kg of ketamine (Dopalen - Agibrands of Brazil Ltda.) as a general anesthetic; and local anesthetic composed of prilocaine hydrochloride 3% associated with felypressin 0, 03 IU / mL (Citanest 3% ® - Dentsply).

Installation of implants

The surgical sites of the right and left tibia were submitted to scaling and antisepsis with iodine alcohol. The incision was performed with number 15 scalpel blade in the region corresponding to the medial surface of the tibia in its proximal third. The cortical tibia was exposed and surgical procedures could be then performed. Throughout this procedure, a copious irrigation with sodium chloride 0, 9% was kept, in order to avoid heating because of the drill friction against the bone.

After that, the drilling for the installation of the implants was performed following the standard diameter drill sequence for implants of 3, 75 x 8, 5 mm height. The implants were installed manually in order to obtain a primary stability and then they were adapted to the cover screws. The rabbits were subjected to six implants installation surgery, one from each group in each tibia (Figure 1).

After the surgical procedure of implant placement, the muscle tissue was sutured with absorbable Number 4 (Monoglyde ® Poliglecarpone 25), the skin sutured with Number 4 silk suture (Ethicon / Johnson & Johnson) and after that, it was made the antisepsis with the use of iodine alcohol. The animals received antibiotic therapy of benzathine benzyl penicillin, procaine benzyl penicillin, potassium benzyl penicillin and dihydrostreptomycin sulphate base, in a glass vials of 6, 000, 000 IU (Pentabiotic - Fort Dodge), intramuscularly at a dose of 1, 35 mL / kg in the immediate postoperative (48 h). After surgery, the rabbits were placed into individual cages with food and water *ad libitum*, and monitored until the time of their euthanasia, at 2 and 6 weeks. Each period of sacrifice was of a group of five rabbits per time.

Euthanasia

For euthanasia procedure, the animals underwent deep general anesthesia (propofol 10mg/kg) intravenously and, after that, they were submitted to the administration of a vial of intravenous potassium chloride in order to sacrifice them.

The right tibiae with the implants were stored in buffered formaldehyde, so they could be evaluated by RP and μ TC.

The left tibiae, with the implants, were stored in Ringer solution, placed inside a freezer at - 20 °C, since this solution maintains the closest to the blood conditions; for a further torque removal test. After this test has been performed, it was then made the MTT cytotoxicity assay.

Analysis by Periapical Radiograph (RP)

In order to obtain the images of the Periapical Radiograph, we used the conventional dental X-ray machine, brand Dabi Atlante, model Spectro 70X Seletronic, and after that, the paralleling technique with 70kV

8mA and with an exposure time of 0, 4 seconds. The film used was Ekataspeed Plus (EP-21p), manufactured by Eastman Kodak Company, (Radiographic Positioner RH – Indusbello ®, from the Dental Instruments Industry Ltda. - Manual).

In order to perform the radiographic technique, the tibias were suitably immobilized on an appropriate table and positioned, in a way that the film could be parallel to the area that we were interested in and the incidence of X-rays were perpendicular to the implants.

The radiographic processing was by the time-temperature method, with new solutions. After that, the PRs were digitized and evaluated by J® Image program version 1, 29x: NIH, Bethesda, MD, USA, for the quantification of densitometry. In this program, the images were then converted into an 8-bit scale with brightness and contrast adjustment program. Images of each implant were cut and processed into separated files and stored in the TFF format.

In each image, the area of interest that was selected was the one between the threads of the implants (right and left of the image), except the last two threads, because some of the images did not show the appropriate settings (Figure 2). After selecting the area of interest, we performed the histogram of each implant for each study group (smooth, sandblasted and anodized)By clicking, this program provides the gray scale values. This histogram provides data on quantification of densitometry, with the mean values of the pixels in the gray scale between 0-255, assigning zero value to the darkest level of gray (black) and 255 for the lightest (white). Thus, values closer to white indicates a better osseointegration.

Assessment by Computed Microtomography (μ TC)

The tibias with the implants were evaluated by a Micro-Tomography X-ray, SkyScan 1176 (Belgium). The parameters for image

reconstruction in μ CT were then the scanning rotation of the parts in 360 degrees, using monochromatic X-rays, with 89 kV and 275 μ A, copper filter 0, 1. The reconstruction of the images used the NRecon software, DataViewer (provided by the same manufacturer of the micro-tomography X-ray, SkyScan 1176 - Belgium) and to quantify the bone formation, the CT-Analyzer software and CT-Vol were used.

After scanning the parts, the images of the cuts were reconstructed individually by the NRecon program from Skycan, and as its result, the cuts are illustrated in Figure 3. CT Analyzer program from Bruker MicroCT (CTAn), in a sectional view, it was selected the region of interest (ROI), which was rectangular, in the cortical bone region, delimitating it, on the same way, for all groups. It was created a volume of interest (VOI), still on the CTAn program, based on a specific ROI. In order to the 3D analysis be performed, for each bone fragment containing an implant, a histogram was adjusted to differentiate the bone implant according to the density of each material (Figure 4).

The parameters of bone volume (BV) were evaluated, after that, the trabecular thickness (Tb.Th), finally, the ratio of the bone volume and also the trabecular volume (BV / TV).

Test for removal torque

After sacrificing the animals, the left tibias were immobilized in a vise, implants were exposed and subjected to reverse torque test, using a digital torque wrench (Mark-10 Corporation, USA). The required force needed to move the inserted implants in the five rabbits, at 2 and 6 weeks period of sacrifice, was measured and the recorded values were those related to the maximum torque for the removal of the implant, which caused the fracture of the implant-bone interface.

Cytotoxicity Evaluation by MTT

There were used 30 rats (*Rattus norvegicus*, Albinus variation, Wistar), male newborns (2-4 days).

Osteogenic cells were isolated by sequential enzymatic digestion, plated, and cultured for up to 14 days as described by Andrade et al., (2015) [31]. The culture solution was changed every three days and the progression of the culture was assessed by phase microscopy in cultures grown on polystyrene wells without implants.

After being cultured for 3 and 10 days, in MTT solution [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma) was added to the cells and they were incubated at 37 °C, for 4 hours to form purple formazan crystals [31, 32]. The cytotoxicity assay was used as a positive control phenol solution 0, 2%.

Then, the supernatant was removed and samples were washed with PBS, followed by addition of 1 mL of isopropanol acid (0, 04 N HCL in isopropanol) added to each well in order to dissolve the formazan crystals. Colorimetric analysis was performed with a EL808IU spectrophotometer (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) at 570 nm. Data was expressed as absorbance.

Statistical analysis

For the evaluation of the data obtained from histomorphometric analysis, we used the computer program STATISTIC (version 5.5, StatSoft Inc., 2000). Descriptive statistics (mean and standard deviation) and inferential, by ANOVA parametric test and when necessary the Tukey's multiple comparison test was performed with 5% level of conventional significance.

RESULTS

Analysis by Scanning Electronic Microscope

SEM analysis was performed with magnifications of 1000 times to G1; of 2000 times to G2; and of 100,000 and 200,000 times to G3. In these magnifications, it was established that the Group 1 demonstrated micro grooves, while Group 2 implants showed a textured surface on a micrometric scale, and Group 3 implants showed the presence of nanotexturized surface of the anodized implant (Figure 5).

Analysis by AFM

According to the AFM images, it was possible to observe the tracks that are inherent to the dental implants machining stage (Figure 6-A), the textured surface in the micrometer scale (Figure 6-B), and appropriate uniformity of a nanotexturized surface from the anodization process (Figure 6 C).

Analysis by EDS

In the analysis by Energy Dispersive Spectroscopy (EDS), an implant of each group was analyzed in order to verify the constituent chemical elements. It was observed the predominance of Ti elements in Group1; Ti and Al elements predominantly in the Group 2 implants; and Ti and O elements predominating in the Group implants 3. In addition, any components other than Ti and O were incorporated into the film of G3 implants. This information is important since it might have formed a sulfate salt, because the anodizing was performed into H_2SO_4 , however, it was not observed.

Analysis by Raman Spectroscopy

The analysis of implant surfaces was conducted by Raman spectroscopy, which provides information about the nanoparticles structures, because it is sensitive to changes in local structural order in a given material.

According to the spectra in Figure 7, bands were observed positioned in regions of anatase in Group 3 implants in the amount of 146.4 cm^{-1} as recorded by Alhomoudi and Newaz [33], wherein the frequency bands were identified as: $147 (\pm 2.8) \text{ cm}^{-1}$, $392.8 (\pm 4.3) \text{ cm}^{-1}$, $515.2 (\pm 5.3) \text{ cm}^{-1}$, $513.14 (7.4 \pm) \text{ cm}^{-1}$, $628.8 (\pm 10.2) \text{ cm}^{-1}$.

However, in Group 2 implants, it was possible to observe a very different situation (Figure 8). Group 1 was not subjected to this analysis, since it is of cp Ti, and this metallic material completely spreads the laser during Raman Spectroscopy. Thus, it is impossible to review this analysis in this study group.

Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)

Figure 9 shows the EIS spectra that were obtained from the complex plane shapes. The extrapolation of the capacitive half circle (Figure 9) up to its intersection with the real axis allows an estimate of the polarization resistance, R_p , determined in the resulting spectrum of the low frequency region. It possible to conclude, this way, that the smallest diameter of the capacitive arc was obtained for commercial sample purposes, with an R_p value of $100 \text{ k}\Omega$ order, or approximately 10 times less than the one that was obtained for the anodized sample purpose; indicating that the Group 2 implant has a higher corrosion potential compared to the implantation of Group 3; once, as the greater (by extrapolating the Y axis of the graph), the greater the corrosion resistance.

Analysis by Periapical Radiograph (PR)

All images were evaluated and the absence of radiolucent halo was found, indicating that all implants osseointegrated, even within a period of 2 weeks.

Then, the images of the implants were analyzed, in the computer program Image J, and a histogram of newly formed bone was conducted around the implant threads. These values were submitted to descriptive analysis and ANOVA analysis of variance. In Figure 10, it can be observed the descriptive data of the histograms of the implants at 2 and 6 weeks period, where the mean values of histograms of G3 implants (anodized-experimental) were higher. The ANOVA variance analysis showed no statistically significant difference between groups in periods of two weeks ($p = 0,99$) and 6 weeks ($p = 0,38$).

Evaluation by μ TC

In Table 1, it is possible to see the descriptive data of the implants, at 2 and 6 weeks, for the evaluated parameters, where it was observed that the mean values of G3 implants (anodized-experimental) were higher. The ANOVA variance analysis showed no statistically significant difference between groups in periods of two weeks ($p = 0,31$) and 6 weeks ($p = 0,36$) for the BV parameter.

For both parameters BV / TV and Tb. Th, the G3 group showed the best results when compared to G1 and G2, with statistically significant difference in the two weeks period ($p < 0,01$ and $p < 0,05$, respectively). However, in the 6-week period, there was no statistically significant difference between groups ($p = 0,1096$) and ($p = 0,07$), respectively. In none of the parameters or periods, statistical differences between G2 and G3 could be observed.

Test for torque removal

Two implants of Group 1 implants (machined) did not osseointegrate, one within a period of 2 weeks, and another within 6 weeks of bone healing, which were excluded from the study.

In dental implants, a value in the removal torque test was obtained, in which a descriptive analysis of values was performed for each group (Figure 11). According to the obtained data, it was possible to observe that the anodized implants demonstrate greater torque removal values than the implants of other groups, for both 2 weeks and also for the period of 6 weeks of osseointegration.

There was statistical difference between Group 1 (machined) and Group 3 (anodized), within a period of 2 weeks ($P < 0,05$), indicating that the anodized implant osseointegration showed higher values than those of machined implants; which means that at the initial period of the bone formation, the experimental implants (Group 3), there are greater cell types which are responsible for the formation of such tissue. Within 6 weeks of osseointegration, there was no statistical difference between groups ($p = 0,14$).

Cytotoxicity Evaluation by MTT

Cell viability was gradually increased in all groups over time (Table 2). The ANOVA showed that there was no statistical difference ($p = 0,77$) between groups and also between them and the control (well only with cells) in the 3-day period. In 10 days, there was statistical difference between the control (well only with cells) and Group 2 ($p < 0,05$), and it showed a higher number of viable cells after exposure to MTT. Thus, none of the implants group was toxic to the cells.

DISCUSSION

Topographical features of dental implant surface are considered a

major factor in osseointegration process. Events such as adhesion, cell proliferation and differentiation, have been optimized for Ti implants with topography modified at the nanoscale [10, 34, 35].

The anodization technique is an electrochemical method for surface modification that improves the bioactivity of Ti orthopedic and dental implants; due to the formation of a single nanotopography that promotes positive effects on cellular activities and has adequate capacity to attract fluid and bone tissue. Is a process of low cost and efficient reproducibility, and its advantages over conventional surface modification methods have been reported in many studies [10, 16-20]

In the dental business there are implants subjected to anodizing process, for example, TiUnite®, Nobel Biocare AB, Gothenburg, Sweden; however, there has always been concern with the morphology of the obtained TiO₂. Mu-Hyon Kim et al., (2015) [11] compared the osseointegration of four different types of implants, cpTi (machined), anodized implant, and Ti submitted to anodizing and etching. The parameters of the anodization procedures were 5% and 3% H₂SO₄ and H₃PO₄ electrolyte solution, 180 V for 3 min; resulting in a rough surface on a micrometric scale. However, in previous studies such as Pinheiro et al., (2014) [36], a nanotexturized surface by anodizing with direct current was obtained, 1 mole Na₂SO₄ as electrolyte solution, 100V for 1 min; as in the study of El-wassefy et al., (2014) [29] where the anodizing parameters were H₂SO₄ solution, 200 V for 4 minutes and then treated for 1 hour at 600 ° C. In our research, the goal was to create an appropriate morphology to TiO₂ (roughness at the nanometer scale), as well as previous studies [29, 36] and a more biocompatible chemical composition by obtaining the anatase phase of TiO₂. This goal was achieved successfully, although we used a longer anodization time (4 hours), which is unprecedented in the literature. This time associated with the previously mentioned parameters (30% duty cycle, 1 mole H₂SO₄ solution as electrolyte, 30 V, 0.2 A and 1000 Hz) resulted in a roughened surface at

the nanometer scale as observed in the SEM analysis (Figure 5) and AFM (Fig 6) as predominant anatase phase, as evidenced in Raman spectroscopy our study (Figure 7). The bands observed were positioned in regions of anatase, as previously registered by other authors [33, 37]. The bands of anatase were only observed in the implants submitted to anodizing.

Furthermore, in our study, anodized implants (Group 3) showed increased thickness of the TiO_2 without generating waste anodizing process, differing from the result of the process developed by Pinheiro et al., (2014) [36] in which Na and S residues have been found from the Na_2SO_4 electrolyte solution. Thus, we believe that the anodizing parameters used in this study were superior.

Impedance measurements represent electrodes in a passive state with varying degrees of compactness of the formed films. This analysis showed that the smallest diameter of the capacitive arc was obtained for commercial sample purposes, with an RP value of 100 $\text{k}\Omega$ order, or approximately 10 times less than the one that was obtained for the anodized sample purpose; indicating that the Group 2 implant has a higher corrosion potential compared to the implantation of Group 3. These variations are in agreement with previous studies [38-42].

For *in vivo* testing, New Zealand white rabbits were selected for use as experimental animals because this species is also known to maintain the uniformity of their genetic characteristics, and, therefore, there is very little difference in the anatomical, histological and physiological characteristics [43]. The bone healing in animals begins during the first week and peaks around 3-4 weeks. Thus, using our periods, which were similar to those reported by El-wassefy et al., (2014) [29], we compared the influence of different surfaces in the initial healing and implant stability in relation to its bioactivity. The bone healing reaches a relative equilibrium with bone remodeling 6 weeks following implant insertion. Furthermore, it is expected that the implants of each group studied are similarly

osseointegrated. Badr and El-Hadary (2007) [44] showed that, analyzing the histology of bone and vascular architecture, they remain constant after longer periods of osseointegration.

Regardless of the period of analysis, histomorphometric evaluation of the interface between bone and implant can be performed by different observation techniques (light microscopy, scanning electron microscopy and microtomography) and considering various parameters [45]. In our study, this analysis was performed by μ CT, since conventional method for histomorphometry involves a careful sample preparation, followed by sections of the samples in very thin sheets, very time consuming and requires a trained technician [46]; the μ CT turn is useful in external and internal view of the same part of the bone without causing damage to the sample. Although the present technical limitations (such as the possible presence of artifacts), the μ CT corresponds well to the conventional histomorphometry and it should be considered as a tool to evaluate the bone structure around the implant [47].

Histomorphometry by μ TC has been the results of some trabecular bone structure procedures [47-49]. There are different methods and parameters to quantify bone parameters by μ CT [47-49]. In our study we determined the ROI from the transverse sections and, like Vandeweghe et al., (2013) [47], data were collected along the axis of the implant at the site where it began the cortical bone. Our results showed significant superiority of experimental implants anodized in all parameters (BV, BV / TV and Tb.Th) in the two observation times (2 and 6 weeks). By analyzing BV/TV and Tb.Th, it was observed that G3 obtained for each of these parameters, nearly the same medium in 2 weeks and 6 weeks; suggesting an important positive influence on the cells that resulted in faster osseointegration than other implants, besides their mean values superior to other groups. However in BV / TV analysis, G3 implants showed average values were slightly lower at 6 weeks when compared to G3 implants at 2 weeks. This may be due to individual differences in healing

of the rabbits sacrificed in this period; still, the G3 implants were always higher than the other groups.

Addition of new bone formation, it is important to check the setting of this implant to this newly formed tissue, therefore, we performed the reverse torque test as reported in previous studies [29, 50, 51]. Investigations showed significant improvements in bone-implant fixation due to change in oxide properties of the surface of Ti implants [29, 50, 51], as also observed in our result with torque test in which the attachment to bone tissue has been strengthened in anodized implants.

Although the use of coming undifferentiated cell cultures of marrow is today the most widely used and studied, there are still many doubts about the reliability of the answers that these experiments bring because when adding any stimulus with the purpose of a cell differentiation, it can interfere with the whole metabolism of the cell and it can bring results that may not match with the reality, so we decided to make use of existing pre-osteoblast cells into the skull of newborn rats based on previous studies [31, 52-55]. In Li et al., (2014) studies [56] which compares cell viability by MTT samples cpTi and cpTi samples submitted to anodization, the improved biocompatibility of the experimental samples was attributed to the nanostructure, high roughness and hydrophilicity of the anodized surface, which have proven to have a positive effect on cellular behavior such as differentiation and significant early bone cell proliferation. In our study, it was found that the average cell viability increased within the time, and the result was also the same of the one from Li et al., al (2014) [56] and Park et al., (2011) [57]. None of the implants groups were then toxic to the cells in both periods of research, which allows then, the use of the trial implant (G3).

CONCLUSIONS

It is possible to conclude that the anodizing procedures used in this study positively affect the chemical and structural composition of the

titanium oxide film, enhancing its biological behavior in osteogenesis, which enables its use in the practice of dental clinic.

REFERENCES

1. Zuo J, Huang X, Zhong X, Zhu B, Sun Q, Jin C, Quan H, Tang Z, ChenW (2013) A comparative study of the influence of three pure titanium plates with different micro- and nanotopographic surfaces on preosteoblast behaviors. *J Biomed Mater Res Part A* 11:3278-84
2. Lai HC, Zhuang LF, Zhang ZY, Wieland M, Liu X (2009) Bone apposition around two different sandblasted, large-grit and acid-etched implant surfaces at sites with coronal circumferential defects: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Res* 20: 247-53.
3. Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovsky S, Donos N, Bosshardt DD (2011) Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clinical Oral Implants Res* 22: 349-56.
4. Shokuhfar T, Hamlekhan A, Chang Jen-Yung, Choi CK, Sukotjo, Friedrich C (2014) Biophysical evaluation of cells on nanotubular surfaces: the effects of atomic ordering and chemistry. *Int J Nanomedicine* 9: 3737–3748.
5. Polizzi G, Gualini F, Friberg B (2013) A Two-Center Retrospective Analysis of Long-Term Clinical and Radiologic Data of TiUnite and Turned Implants Placed in the Same Mouth. *Int J Prosthodont.* 26(4):350-8.
6. Vasconcellos LMR, Nascimento FO, Leite DO, Vasconcellos LGO, Prado RF, Ramos CJ, et al. (2012) Novel production method of porous surface Ti samples for biomedical application. *J Mater Sci: Mater Med* 23:357–364.
7. Wennerberg A, Albrektsson T (2009) Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical Oral Implants Res* 4: 172-84.
8. Stanford CM (2010) Surface modification of biomedical and dental implants and the process of inflammation wound healing and bone

- formation. *Int. J Mol Sci* 11: 354-69.
9. Buser D, Brogini N, Wieland M, Shenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffman B, Lussi A, Steinemann SG (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 83: 529-33.
 10. Rieger E, Dupret-Bories A, Salou L, Metz-Boutigue MH, Layrolle P, Debry C, Lavallo P, Vrana NE (2015) Controlled implant/soft tissue interaction by nanoscale surface modifications of 3D porous titanium implants. *Nanoscale* 7: 9908–9918.
 11. Mu-Hyon Kim, Kyeongsoon Park, Kyung-Hee Choi, Soo-Hong Kim, Se Eun Kim, Chang-Mo Jeong, Jung-Bo Huh (2015) Cell Adhesion and in Vivo Osseointegration of Sandblasted/Acid Etched/Anodized Dental Implants. *Int. J. Mol. Sci* 16: 10324-10336
 12. Doroudian G, Curtis MW, Gang A, Russell B (2013) Cyclic strain dominates over microtopography in regulating cytoskeletal and focal adhesion remodeling of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 3:1040–1046
 13. Yu WQ, Zhang YL, Jiang XQ, Zhang FQ (2010) In vitro behavior of MC3T3-E1 preosteoblast with different annealing temperature titania nanotubes. *Oral Dis* 7:624–630.
 14. Von der Mark K, Park J, Bauer S, Schmuki P (2010) Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 1:131–153.
 15. Yao C, Slamovich EB, Webster TJ (2008) Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. *J Biomed Mater Res A* 1:157–166.
 16. Li Y, Gao Y, Shao B, Xiao J, Hu K, Kong L (2012) Effects of hydrofluoric acid and anodized micro and micro/nano surface implants on early osseointegration in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.*8:779-83.
 17. Xiao J, Zhou H, Zhao L, Sun Y, Guan S, Liu B, Kong L (2011) The effect of hierarchical micro/nanosurface titanium implant on osseointegration in ovariectomized sheep. *Osteoporos Int.* 6:1907-13.
 18. Adamek G, Jakubowicz J (2010) Mechano-electrochemical synthesis and properties of porous nano-Ti-6Al-4V alloy with hydroxyapatite layer

- for biomedical applications. *Electrochemistry Communications* 12: 653-656
19. Yu X, Li Y, Wlodarski, W., Kandasamy S, Kalantar-Zadeh K (2008) Fabrication of nanostructured TiO₂ by anodization: a comparison between electrolytes and substrates. *Sensors and Actuators B* 130: 25-31.
 20. Williamson RS; Disegi J, Griggs JÁ, Roach MD (2013) Nanopore formation on the surface oxide of commercially pure titanium grade 4 using a pulsed anodization method in sulfuric acid. *J Mater Sci: Mater Med* 24: 2327-2335.
 21. Habazaki H, Uozumi M, Konno H (2003) Crystallization of anodic titania on titanium and its alloys. *Corrosion Science* 45: 2063-73.
 22. Yamagami A, Nagaoka N, Yoshihara K, Nakamura M, Shirai H, Matsumoto T, Suzuki K, Yoshida Y (2014) Ultra-structural evaluation of an anodic oxidated titanium dental implant *Dent Mater J.* 6:828-34.
 23. Niinomi M (2008) Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. Review article. *J Mechan Behavior of Biomed Mater* 1:30-42.
 24. Castner DG, Ratner BD (2013) Biomedical surface science: foundations to frontiers. *Surface Science* 500: 28-60.
 25. Sul Y.T, Johansson C.B, Petronis S. et al., (2012^a) Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials* 23: 491-501.
 26. Elias CN, Serra LE (2006) Biocompatibilidade do titânio e a superfície vulcano. (Biocompatibility of titanium and volcanic surfaces) *Brasileira de Implantodontia. (Brazilian Implantodology)* 3: 6-11.
 27. Lavenus S, Trichet V, Le Chevalier S, Hoornaert A, Louarn G, Layrolle P (2012) Cell differentiation and osseointegration influenced by nanoscale anodized titanium surfaces. *Nanomedicine* 7:967-80
 28. YT Sul, C Johansson, S Petronis, A Krozer, Y Jeong, A Wennerberg, T Albrektsson (2002) Characteristics of the surface oxides on turned and

electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition, *Biomaterials* 23: 491-501.

29. El-wassefy NA, Hammouda IM, Habib AN, El-awady GY, Marzook HA (2014) Assessment of anodized titanium implants bioactivity 2:1-9.
30. Kim K, Lee BA, Piao XH, Chung HJ, Kim YJ (2013) Surface characteristics and bioactivity of an anodized titanium surface. *J Periodontal Implant Sci* 43: 198-205.
31. Andrade DP, Vasconcellos LMR, Carvalho ICS, Forte LFBP, Santos ELS, Prado RF, Santos DR, Cairo CAA, Carvalho YR (2015) Titanium–35niobium alloy as a potential material for biomedical implants: In vitro study. *Materials Science and Engineering C* 56: 538–544.
32. AL Rosa, GE Crippa, PT de Oliveira, M Taba Jr., LP Lefebvre, MM Beloti (2009) Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy, *Clin. Oral Implants Res.* 20: 472–481.
33. Alhomoudi IA, Newaz G (2009) Residual stresses and Raman shift relation in anatase TiO₂ thin film. *Thin Solid Films* 517: 4372-4378
34. Zhang W, Li Z, Huang Q, et al., (2013) Effects of a hybrid micro/nanorod topography-modified titanium implant on adhesion and osteogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine* 8:257–265.
35. Zhang W, Li Z, Liu Y, et al., (2012) Biofunctionalization of a titanium surface with a nano-sawtooth structure regulates the behavior of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine* 7: 4459–4472.
36. Pinheiro FAL, Carlos Mourão FAB, Diniz VS, Silva PC, Meirelles L, Santos Junior E, Schanaider A (2014) In-vivo bone response to titanium screw implants anodized in sodium sulfate. *Acta Cirúrgica Brasileira* 6: 376-82.
37. Liu JH, Yi JL, Li SM, Yu M, Xu YZ (2009) Fabrication and characterization of anodic films on a Ti-10V-2Fe-3Al titanium alloy. *International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials* 16: 96-100

38. Raman V, Nagarajan S, Rajendran N. (2006). Electrochemical impedance spectroscopy characterization of passive film formed over Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy. *Electrochemistry Communications* 8: 1309-1314.
39. Alves VA, Reis RQ, Santos ICB, Souza DG, Gonçalves, T, Pereira da Silva MA, Rossi A, da Silva L A. (2009). In situ impedance spectroscopy study of the electrochemical corrosion of Ti and Ti-6Al-4V in simulated body fluid at 25 °C and 37 °C. *Corrosion Science* 51: 2473-2482.
40. Souza MEP, Ballester M, Freire CMA. (2007). EIS characterisation of Ti anodic oxide porous films formed using modulated potential. *Surface Coatings & Technology* 201: 7775-7780.
41. Simka W, Sadkowski A, Warczak M, Iwaniak A, Dercz G, Michalska J, Maciej A. (2011). Characterization of passive films formed on Ti during anodic oxidation. *Electrochimica Acta* 56: 8962-8968.
42. Marino CEB, Mascaro LH. (2004). EIS characterization of a Ti-dental implant in artificial saliva media: dissolution process of the oxide barrier. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 568: 115-120.
43. Lugero GG, De Falco Caparbo V, Guzzo ML, Koing Júnior B, Jorgetti V (2000) Histomorphometric evaluation of titanium implants in osteoporotic rabbits. *Implant Dent* 4: 303-9.
44. Badr NA, El-Hadary AA. (2007) Hydroxyapatite-Electroplated cp-Titanium implant and its bone integration potentiality: an in vivo study. *Implant Dentistry* 16: 297–304.
45. Park YS, Yi KY, Lee IS, Jung YC (2005) Correlation between microtomography and histomorphometry for assessment of implant osseointegration. *Clin. Oral Impl. Res* 16: 156-60
46. Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van der Perre G, Dequeker J, Hilderbroend T, Ruegsegge r P (1998) Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological section and microcomputed tomography. *Bone* 1: 59-66.
47. Vandeweghe S, Coelho PG, Vanhove C, Wennerberg A, Jimbo R. (2013) Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: A comparison with histomorphometry. *J Biomed Mater Res Part B* 101:1259–1266.

48. Sung-Won Kang, Woo-Jin Lee, Soon-Chul Choi, Sam-Sun Lee, Min-Suk Heo, Kyung-Hoe Huh, Tae-Il Kim, Won-Jin Yi (2015) Volumetric quantification of bone-implant contact using micro-computed tomography analysis based on region-based segmentation. *Imaging Science in Dentistry* 45: 7-13
49. Shichong Qiao, Huiliang Cao, Xu Zhao, Hueiwen Lo, Longfei Zhuang, Yingxin Gu, Junyu Shi, Xuanyong Liu, Hongchang Lai (2015) Ag-plasma modification enhances bone apposition around titanium dental implants: an animal study in Labrador dogs. *International Journal of Nanomedicine* 10: 653–664
50. Yang J, Pham SM, Crabbe DL (2003) High-resolution micro-CT evaluation of mid-to-long term effects of estrogen deficiency on rat trabecular bone. *Academic Radiology* 10: 1153-58.
51. Cui X, Kim HM, Kawashita M, Wang L, Xiong T, Kokubo T, Nakamura T. (2009). Preparation of bioactive titania films on titanium metal via anodic oxidation. *Dental Materials* 25: 80–86.
52. Schwartz HO, Novaes AB Jr, de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT (2007) In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with addition submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res* 3:333-44
53. Variola F, Brunski JB, Orsini G, Oliveira PT, Wazen R, Nanci A (2011) Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale* 3:335–353.
54. Wang X, Li Y, Xiong J, Hodgson PD, Wen C (2009) Porous TiNbZr alloy scaffolds for biomedical applications. *Acta Biomater* 9:3616-24.
55. Pereira KK, Alves OC, Novaes Jr AB, Oliveira FS, Yi JH, Zaniquelli O, Wolf-Brandstetter C, Scharnweber D, Variola F, Nanci A, Rosa AL, Oliveira PT (2013) Progression of osteogenic cell cultures grown on microtopographic titanium coated with calcium phosphate and functionalized with a type I collagen-derived peptide. *J Periodontol* 8: 1199-1210.
56. Baoye Li, Ying Li, Jun Li, Xiaolong Fu, Haipeng Li, Hongshui Wang, Shigang Xin, Linxi Zhou, Chunyong Liang, Changyi Li (2014) Influence of nanostructures on the biological properties of Ti implants after anodic oxidation. *J Mater Sci: Mater Med* 25:199–205

57. Park CH, Lee CS, Kim YJ, Jang JH, Suh JY, Park JW (2011) Improved pre-osteoblast response and mechanical compability of ultrafine-grained Ti-13Nb-3Zr alloy. Clin. Oral Impl. Res 22:735-742.

CAPTIONS FOR FIGURES

Figure 1 - Surgical sequence: A) incision with a 15 blade; B) cortical bone exposure; C) Making surgical sites with standardized drills and constant irrigation with sodium chloride 0.9%; D) Surgical Sites; E) Installation of implants; F) installed implants and adapted cover screws.

Figure 2 - Area of interest selected among the threads of the anodized implant into the implant within 2 weeks.

Figure 3 - Reconstructed image G3 implant μ CT within a 6-week period.

Figure 4 - 3D BOI View (volume of interest) from the CT-Vol software. Image without the implant (central region) and the bone tissue from the selected ROI can be observed: A) Machined implant (G1) 2 weeks; B) Implant Rough (G2) in 2 weeks; C) Implantation anodized (G3) at 2 weeks; D) machined implant (G1) within 6 weeks; E) Rough implant (G2) within the 6-week period; F) Anodized implant (G3) within the 6-week period. Visually, there was a greater amount of cortical bone for Group 3 implants, both within the period from 2 weeks to 6 weeks; compared to other implants.

Figure 5 - A) G1 implant surface at a 1000x magnification (10μ). Note the presence of grooves on the surface inherent to the machining process. B) G2 textured implant surface by inkjet technique of aluminum oxide (Al_2O_3) followed by acid etching. It is possible to see some metal grooves and also some cuts caused by the shock of the oxide particles

against the surface of the implant, resulting in increased roughness in 2000x (10 μ). C) nanotexturized implant surface G3 increased in 100,000 times (200nm) and D) nanotexturized implant surface G3 increased in 200,000 times (100nm).

Figure 6 - Topography of the surfaces of the implants, A) G1 and B) G2 and C) G3.

Figure 7 - Oscilloscope data for Group 3 implants (by anodizing pulsed current) demonstrating the presence of anatase phase (A and B).

Figure 8 - Raman Spectroscopy for Group 2 implants, demonstrating the absence of anatase phase.

Figure 9 - EIS spectra obtained in the form of the complex plane, the modified titanium surfaces in NaCl 0.9%.

Figure 10 - Graph 1 of the averages of the histogram data of the implants in the 2 and 6 week period.

Figure 11 - Graph of the averages of the removal torque values for the implants machined, anodized and treated after 2 and 6 weeks from the surgery implant placement.

ARTICLE ANALYSIS

Based on the literature and also on the results, it can be stated that the implants, submitted to anodization procedure, with the parameters used in this experiment, allow obtaining the nanotexture (morphology that favors attraction and cell growth) and crystalline and more biocompatible anatase phase.

Analyses of μ CT and reverse torque testing demonstrated that the anodized experimental implant showed superiority to other studied implants; Furthermore, in the period of 2 weeks, a similar result was showed at 6 weeks; indicating that the osseointegration of implants as well as anodized besides being better, it can also happen within a shorter period.

Thus, an increase in bone formation at the interface of anodized implants; which makes this surface a promising experimental implant to be use in the dental clinic of Implantology.

FIGURES

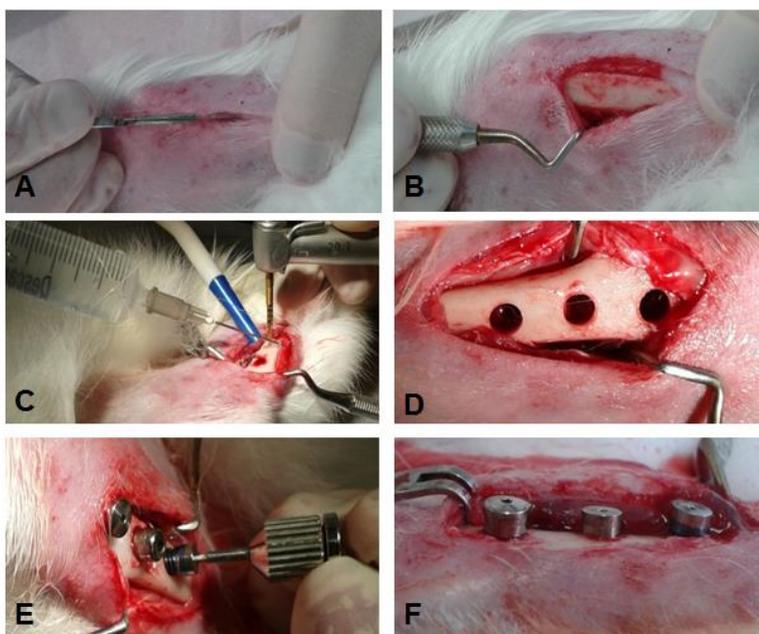


Figure 1 - Surgical sequence: A) incision with a 15 blade; B) cortical bone exposure; C) Making surgical sites with standardized drills and constant irrigation with sodium chloride 0.9%; D) Surgical Sites; E) Installation of implants; F) installed implants and adapted cover screws.

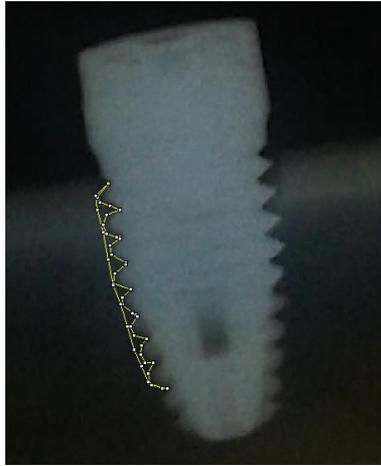


Figure 2 - Area of interest selected among the threads of the anodized implant into the implant within 2 weeks.

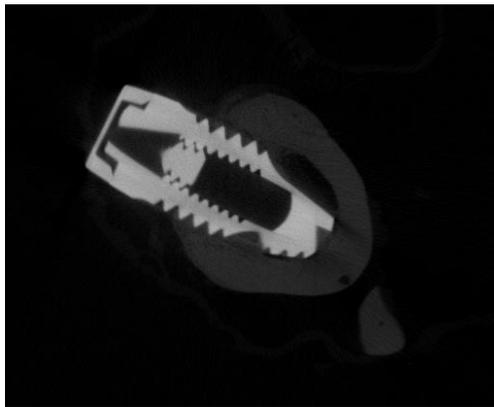


Figure 3 - Reconstructed image G3 implant μ CT within a 6-week period.

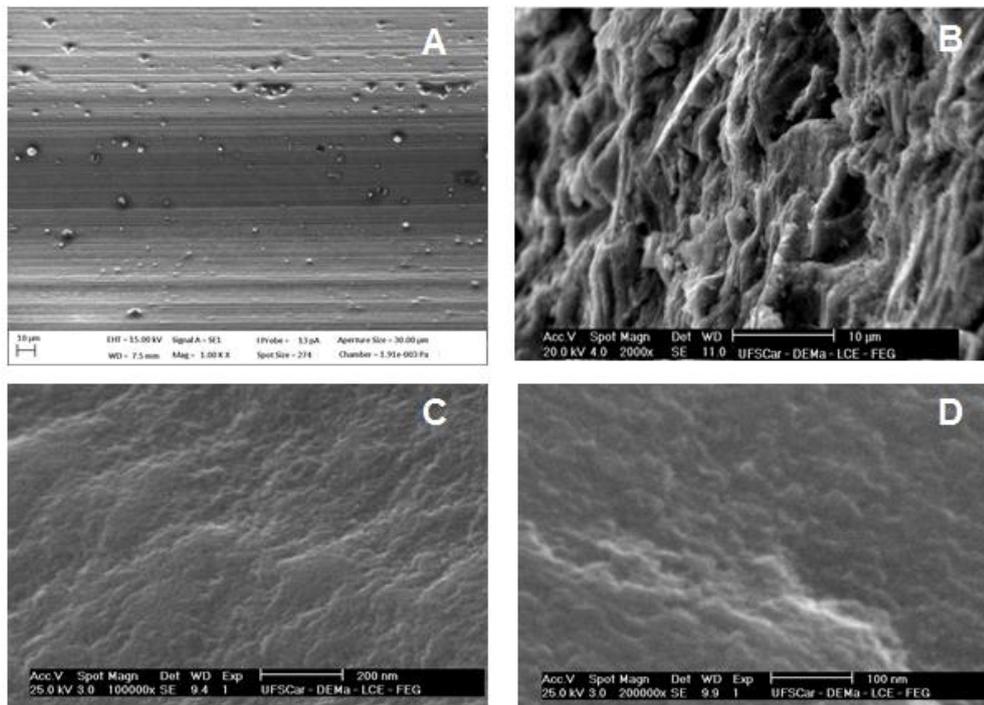


Figure 5 - A) G1 implant surface at a 1000 x magnification (10 μ). Note the presence of grooves on the surface inherent to the machining process. B) G2 textured implant surface by inkjet technique of aluminum oxide (Al_2O_3) followed by acid etching. It is possible to see some metal grooves and also some surface defects caused by the shock of the oxide particles against the surface of the implant, resulting in increased roughness in 2000 x (10 μ). C) nanotexturized implant surface G3 increased in 100.000 times (200 nm) and D) nanotexturized implant surface G3 increased in 200,000 times (100 nm).

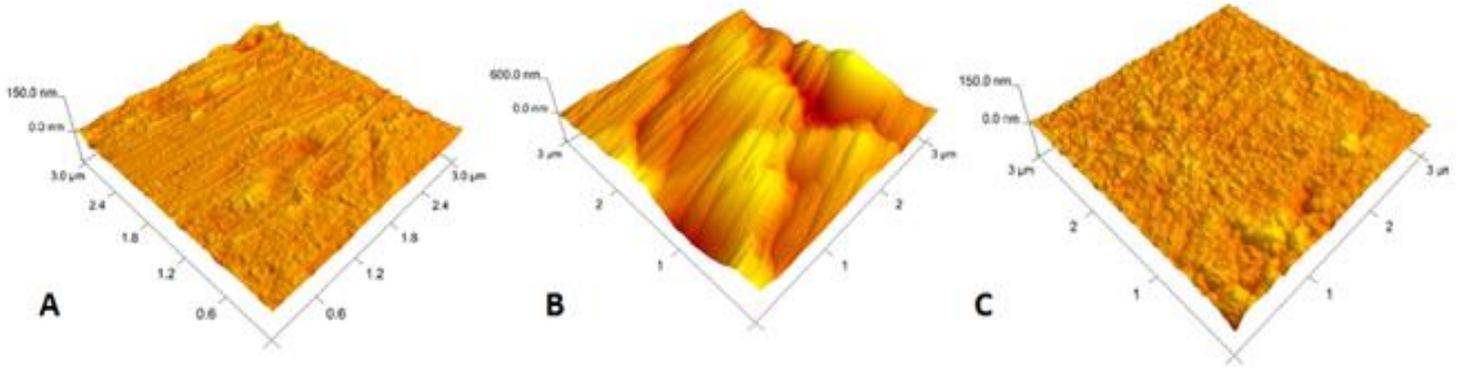


Figure 6 - Topography of the surfaces of the implants, A) G1, B) G2 and C) G3.

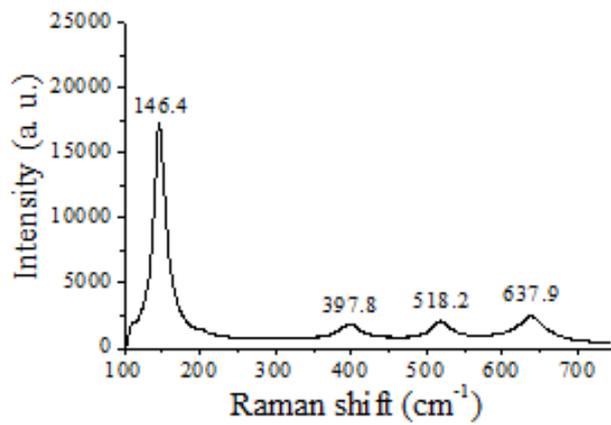


Figure 7 - Oscilloscope data for Group 3 implants (by anodizing pulsed current) demonstrating the presence of anatase phase.

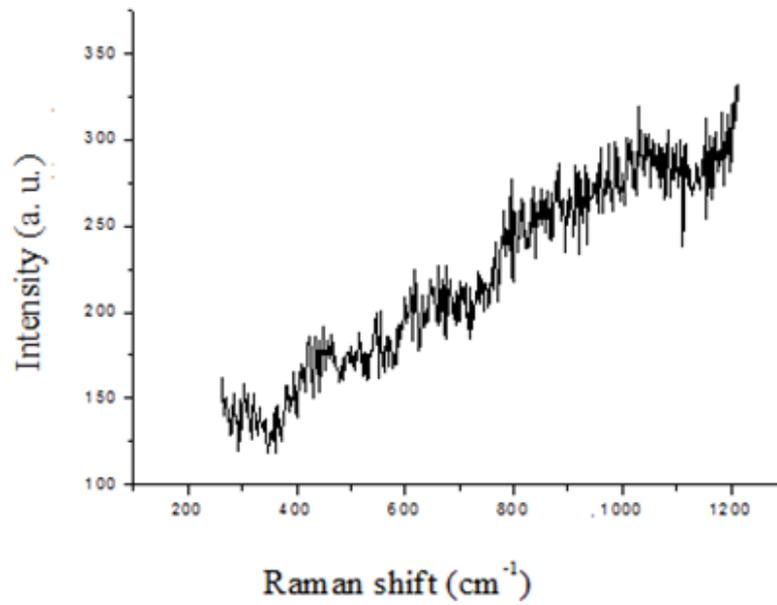


Figure 8 - Raman Spectroscopy for Group 2 implants, demonstrating the absence of anatase phase.

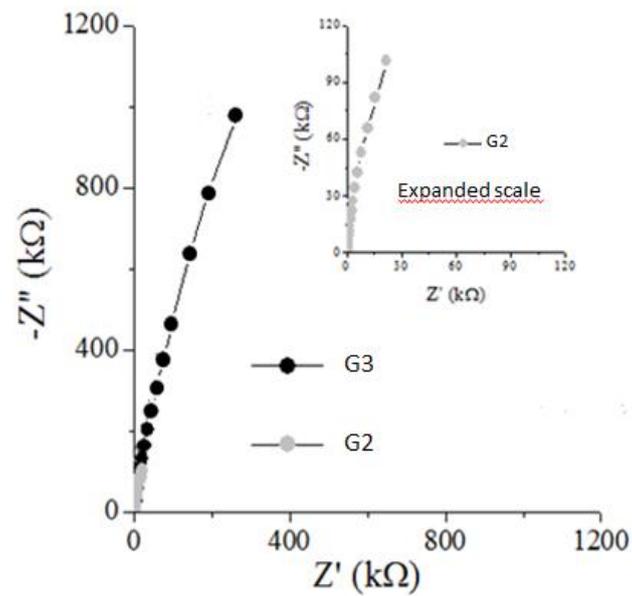


Figure 9 - EIS spectra obtained in the form of the complex plane, the modified titanium surfaces in NaCl 0.9%.

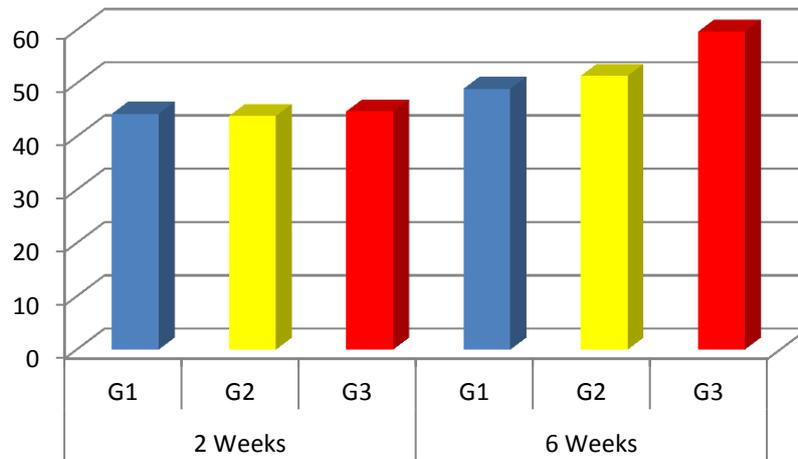


Figure 10 - Graph 1of the averages of the histogram data of the implants in the 2 and 6 week period.

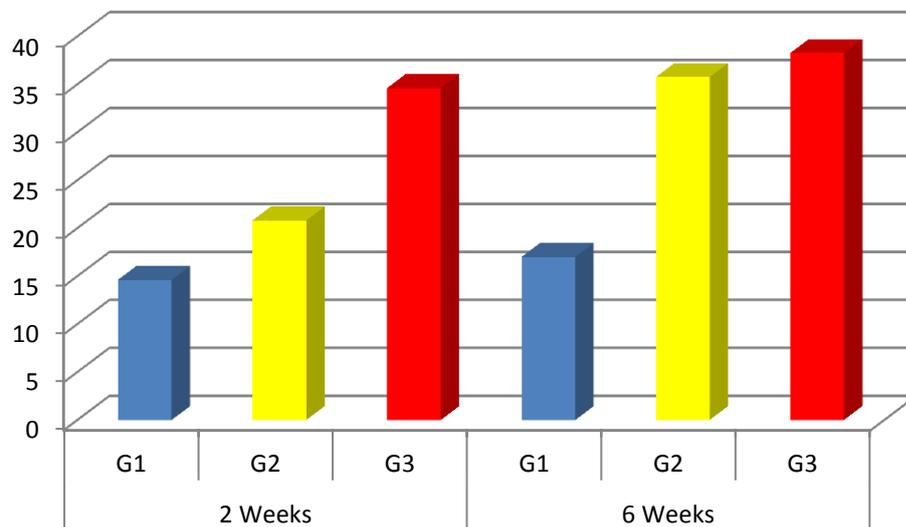


Figure 11 - Graph of the averages of the removal torque values for the implants machined, anodized and treated after 2 and 6 weeks from the surgery implant placement

TABLES

Table 1 - Descriptive analysis of bone volume (BV), ratio of bone volume and trabecular volume (BV / TV), trabecular thickness (Tb.Th), within 2 and 6 weeks.

BV	2W			6W		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Median	1109848	774343,9	2242730	1515175	1730993,2	2335791
Mean	1134549	1537149	2196584	1619286	2456511	4044530
Standard Deviation	284485	1574107	192414	158733	1931716,5	4085317
BV/TV						
Median	27,74%	24,57%	44,05%	33,64%	33,43%	37,99%
Mean	29,44%	24,55%	45,87%	32,66%	34,77%	39,31%
Standard Deviation	4,3852	2,4968	4,8741	4,4004	3,6702	5,6816
Tb.Th						
Median	12,8334	13,881	21,7185	12,1649	18,6903	23,6866
Mean	13,2203	13,1051	22,1562	15,1669	18,18	21,5408
Standard Deviation	2,6753	4,9921	1,0887	5,1124	1,847	4,3067

Table 2 - Descriptive analysis of the values of viable cells by MTT cytotoxicity test in the periods of 3 and 10 days.

MTT	3 D				10 D			
	Contr	G1	G2	G3	Contr	G1	G2	G3
Median	0,095	0,088	0,097	0,118	0,293	0,357	0,382	0,334
Mean	0,094	0,088	0,1022	0,1096	0,2718	0,338	0,3952	0,303
Standard Deviation	0,0104	0,0085	0,0136	0,017	0,0641	0,0864	0,041	0,0484

5 REFERÊNCIAS

Adamek G, Jakubowicz J. Mechanoelectrochemical synthesis and properties of porous nano-Ti-6Al-4V alloy with hydroxyapatite layer for biomedical applications. *Electrochem Commun* 2010;12(5):653-6. doi:10.1016/j.elecom.2010.02.023

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*. 1981 Dec;10(6):387-416.

Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom 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.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001 Oct;10 Suppl 2:S96-101.

Albrektsson T. A multicenter report on osseointegrated oral implants. *J Prosthet Dent*. 1988 Jul;60(1):75-84.

Al-NawasB, Groetz KA, Goetz H, Duschner H, Wagner W. Comparative histomorphometry and resonance frequency analysis of implants with moderately rough surfaces in a loaded animal model. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Jan;19(1):1-8.

Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med (Berl)*. 1998 Mar;76(3-4):253-65.

Boyd SK, Davison P, Muller R, Gasser JA. Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo. Microcomputed tomography. *B Bone*. 2006 Oct;39(4):854-62.

Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*. 1983 Sep;50(3):399-410.

Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine R, Breine U, Lindstrom J, et al. Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaws. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977;16:1-132.

*Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

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

Brunsky JB, Puelo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 Jan-Feb;15(1):15-46.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1991 Jul;25(7):889-902.

Buser D, Brogini N, Wieland M, Shenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res.* 2004 Jul;83(7):529-33.

Busquim TP, Kuri SE, Elias CN, Lima JHC, Muller CA. Caracterização dos óxidos de titânio das superfícies de implantes dentários com diferentes tratamentos. *Implant News.* 2012 Sep-Oct;9(2):207-14.

Carr AB, Gerard DA, Larsen PE. Quantitative histomorphometric description of implant anchorage for three types of dental implants following 3 months of healing in baboons. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997 Nov-Dec;12(6):777-84.

Castilho GAA, Martins MD, Macedo AA. Surface characterization of titanium based dental implant. *Braz J Phys.* 2006 Sep;36(3):1004-8.

Castner DG, Ratner BD. Biomedical surface science: foundations to frontiers. *Surf Sci.* 2013 Mar 10;500(1-3):28-60.

Caulier H, Van der Waerden JPCM, Wolke JGC, Kalk W, Naert I, Jansen JA. A histological and histomorphometrical evaluation of the application of screw-designed calciumphosphate (Ca-P)-coated Implants in cancellous maxillary bone of the goat. *J Biomed Mater Res.* 1997 Apr;35(1):19-30.

Celletti R, Marinho VC, Traini T, Orsini G, Bracchetti G, Perrotti V, et al. Bone contact around osseointegrated implants: a histologic study of acidetched and machined surfaces. *J Long Term Eff Med Implants.* 2006;16(2):131-43.

Chilvarquer I, Chilvarquer LW, Hayek JH, Saddy MS. Aplicação da radiologia e imageologia bucomaxilofacial na ortodontia e ortopedia funcional dos maxilares. In: Rode SM, Gentil SN. *Atualização clínica em Odontologia.* São Paulo: Artes Médicas. 2005. p. 143-56.

Chistenson EM, Anseth KS, Van den Beucken JJ, Chan CK, Ercan B, Jasen JA, et al.. Nanobiomaterial application in orthopedics. *J Orthop Res*. 2007 Jan;25(1):11-22.

Choi JY, Lee HJ, Jang JU, Yeo IS. Comparison between bioactive fluoride modified and bioinert anodically oxidized implant surfaces in early bone response using rabbit tibia model. *Implant Dent*. 2012 Apr;21(2):124-8. doi: 10.1097/ID.0b013e318249f283.

Cordioli G, Majzoub Z, Piattelli A, Scarano A. Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 Sep-Oct;15(5):668-74.

Davis GR, Wong FS. X-ray microtomography of bones and teeth. *Physiol Meas*. 1996 Aug;17(3):121-46.

De Assis JT. Microtomografia utilizando tubos de Raios X [tese]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa, UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1992.

Doroudian G, Curtis MW, Gang A, Russell B. Cyclic strain dominates over microtopography in regulating cytoskeletal and focal adhesion remodeling of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jan 18;430(3):1040-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.120.

Elias CN, Meirelles L. Improving osseointegration of dental implants. *Expert Rev Med Devices*. 2010 Mar;7(2):241-56. doi: 10.1586/erd.09.74.

Elias CN. Diferentes superfícies dos implantes dentários. III Congresso Latino Americano de Órgãos artificiais e Biomateriais; 2004; Campinas, SP.

Elias CN. Variações da superfície dos implantes osseointegráveis. Congresso em Ciência dos materiais; 2002; Joinville, SC.

Elias CN, Serra LE. Biocompatibilidade do titânio e a superfície vulcano. *Rev Bras Implant*. 2006 Jul-Sep;12(3):6-11.

El-wassefy NA, Hammouda IM, Habib AN, El-awady GY, Marzook HA. Assessment of anodized titanium implants bioactivity. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Feb;25(2):e1-9. doi: 10.1111/clr.12031.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res*. 1989 Feb;4(1):3-11.

Goene RJ, Testori T, Trisi P. Influence of a nanometer-scale surface enhancement on the novo bone formation on titanium implants: a histomorphometric study in human maxillae. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007 Jun;27(3):211-9.

Gottlander M, Albrektsson T, Carlsson LV. A histomorphometric study of unthreaded hydroxyapatite-coated and titanium-coated implants in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992 Winter;7(4):485-90.

Goulet RW, Goldstein AS, Ciarelli MJ, Kuhn JL, Brown MB, Feldkamp LA. The relationship between the structural and orthogonal compressive-properties of trabecular bone. *J Biomech*. 1994 Apr;27(4):375-89.

Groisman M, Vidigal Jr GM. Tipos de superfícies de implantes. In: *Sobrape. Periodontia e implantodontia: atuação clínica baseada em evidências científicas*. São Paulo: Artes Médicas; 2005. v. 2 . p. 1-14.

Gupta A, Dhanraj M, Sivagami G. Status of surface treatment in endosseous implant: a literary overview. *Indian J Dent Res*. 2010 Jul-Sep;21(3):433-8. doi: 10.4103/0970-9290.70805.

Habazaki H, Uozumi M, Konno H, Shimizu K, Skeldon P, Thompson GE. Crystallization of anodic titania on titanium and its alloys. *Corros Sci*. 2003 Sep;45(9):2063-73.

Instituto do Sorriso [internet]. Implantodontia. 2010 [acesso 10 Nov 2015]. Disponível em: <http://institutosorriso.webs.com/implantodontia.htm>

Ivanoff CJ, Widmark G, Johansson C, Wennerberg A. Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium microimplants in the human jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 May-Jun;18(3):341-8.

Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Apr;12(2):128-34.

Johansson CB, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: a 1-yr follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1987 Spring;2(2):69-75.

Kim YH, Koak JY, Chang IT, Wennerberg A, Heo SJ. A histomorphometric analysis of the effects of various surface treatment methods on osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 May-Jun;18(3):349-56.

Lai HC, Zhuang LF, Zhang ZY, Wieland M, Liu X. Bone apposition around two different sandblasted, large-grit and acid-etched implant surfaces at sites with coronal circumferencial defects: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Mar;20(3):247-53. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01651.x.

Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovsky S, Donos N, Bosshardt DD. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Apr;22(4):349-56. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02172.x.

Lavenus S, Trichet V, Le Chevalier S, Hoornaert A, Louarn G, Layrolle P. Cell differentiation and osseointegration influenced by nanoscale anodized titanium surfaces. *Nanomedicine (Lond).* 2012 Jul;7(7):967-80. doi: 10.2217/nnm.11.181.

Li Y, Gao Y, Shao B, Xiao J, Hu K, Kong L. Effects of hydrofluoric acid and anodized micro and micro/nano surface implants on early osseointegration in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2012 Dec;50(8):779-83. doi: 10.1016/j.bjoms.2011.12.008.

Liu Y, Layrolle P, de Bruij J, Van Blitterswijk C, de Groot K. Biometric coprecipitation of calcium phosphate and bovine serum albumin of titanium alloy. *J Biomed Mater Res.* 2001 Dec 5;57(3):327-35.

Liu Y, Hunziker EB, de Groot K, Layrolle P. Introduction of ectopic bone formation by BMP-2 incorporated biomimetically into calcium phosphate coatings of titanium alloy implants. In: Ben-Nissan B, Sher D, Walsh W. *Key Engineering materials.* Durnten: Trans Tech Publications; 2002. P. 667-70. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.240-242.667

Lopes RT, Rodrigues JL, Assis JT, de Jesus EFO, Oliveira LF. Evaluation of a microtomography system with na X-ray microfocus tube. *Appl Radiat Isot.* 1997 Oct-Dec;48(10-12):1437-42.

López JCRR. Avaliação histomorfométrica da porcentagem de osseointegração ao redor de implantes recobertos por hidroxiapatita por meio de dois métodos de secção histológica [dissertação]. Duque de Caxias (RJ): Universidade do Grande Rio; 2007.

Meirelles L. Nanoestruturas e a resposta óssea. Uma alternativa segura para a reabilitação com implantes osseointegráveis. *Implant News.* 2010 Mar-Abr;7(2):169-72.

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.

Mendonça G, Mendonça DB, Simões LG, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, et al. Nanostructured alumina-coated implant surface: effect on osteoblast-related gene expression and bone-to-implant contact in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Mar-Apr;24(2):205-15.

Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão FJL, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology-From micron to nanotopography. *Biomaterials*. 2008 Oct;29(28):3822-35. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.012.

Mercer CE, Anderson P. X-ray microtomography a novel technique for the quantification of effects in enamel following CO₂ laser application. *Br Dent J*. 1996 Jun 22;180(12):451-5.

Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van der Perre G, Dequeker J, Hilderbroend T, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological section and microcomputed tomography. *Bone*. 1998 Jul;23(1):59-66.

Narayanan R, Seshadri SK. Phosphoric acid anodization of Ti-6Al-4V – Structural and corrosion aspects. *Corros Sci*. 2007;49(2):542-58. doi: 10.1016/j.corsci.2006.06.021

Niinomi M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. Review article. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2008 Jan;1(1):30-42. doi: 10.1016/j.jmbbm.2007.07.001.

Nyman S, Munoz S, Jadhav S, Mansour A, Yoshi T, Mundy GR, et al. Quantitative measures of femoral fracture repair in rats derived by micro-computed tomography. *J Biomech*. 2009 May 11;42(7):891-7. doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.01.016.

Orsini G, Piattelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piattelli A. Randomized controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. *J Periodontol*. 2007 Feb;78(2):209-18.

Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface*. 2010 Oct 6;7 Suppl 5:S515-27. doi: 10.1098/rsif.2010.0118.focus.

Park YS, Yi KY, Lee IS, Jung YC. Correlation between microtomography and histomorphometry for assessment of implant osseointegration. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Apr;16(2):156-60.

Pebé P, Bardot R, Trinidad J, Pesquera A, Lucente J, Nishimura R. Countertorque testing and histomorphometric analysis of various implant surfaces in canines: a pilot study. *Implant Dent.* 1997 Winter;6(4):259-65.

Pinto LESC, Elias CN. Análise química e topográfica de implantes de titânio após tratamentos químicos de superfície. IV Congresso Latino Americano de Órgãos artificiais e Biomateriais; 2006; Caxambu. MG.

Polizzi G, Gualini F, Friberg B. A two-center retrospective analysis of long-term clinical and radiologic data of TiUnite and turned implants placed in the same mouth. *Int J Prosthodont.* 2013 Jul-Aug;26(4):350-8. doi: 10.11607/ijp.3386.

Postnov AA, Vinogradov AV, Van Dyck D. Quantitative analysis of bone mineral content by X-ray microtomography. *Physiol Meas.* 2003 Feb;24(1):165-78.

Rodrigues MES. Análise da relação entre osteopenia induzida por ovariectomia e perda dentária em ratas wistar [dissertação]. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará; 2008.

Santos Junior E. Anodização de Titânio comercialmente puro para aplicações biomiméticas [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2005.

Silva JC. Estudo comparativo de superfícies de titânio utilizadas em implantes [tese]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2006.

Shokuhfar T, Hamlekhan A, Chang JY, Choi CK, Sukotjo C, Friedrich C. Biophysical evaluation of cells on nanotubular surfaces: the effects of atomic ordering and chemistry. *Int J Nanomedicine.* 2014 Aug 12;9:3737-48. doi: 10.2147/IJN.S67344.

Stanford CM. Surface modification of biomedical and dental implants and the process of inflammation, wound healing and bone formation. *Int J Mol Sci.* 2010 Jan 25;11(1):354-69. doi: 10.3390/ijms11010354.

Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hidroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue implants. *J Mater Res.* 1998;13(1):94-117. doi: 10.1557/JMR.1998.0015.

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 Sep-Oct;15(5):675-90.

Teixeira ER. Superfície dos implantes: o estágio atual. In: Dinato JC, Polido WD. *Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese*. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p. 63-80.

Trisi P, Rao W, Rebaudi A. A histometric comparison of smooth and rough titanium implants in human low-density jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 Sep-Oct;14(5):689-98.

de Vasconcellos LMR, Nascimento FO, Leite Dde O, de Vasconcellos LGO, do Prado RF, Ramos CJ, et al. Novel production method of porous surface Ti samples for biomedical application. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Feb;23(2):357-64. doi: 10.1007/s10856-011-4515-0.

Vidigal Jr GM. Avaliação histológica e histomorfométrica da interface implante-osso de implantes imediatos instalados em sítios sadios e em sítios infectados na mandíbula de cães [tese]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Gama Filho; 1996.

Vignoletti F, Johansson C, Albrektsson T, De Santis M, San Roman F, Sanz M. Early healing of implants placed into fresh extraction sockets: an experimental study in the beagle dog. De novo bone formation. *J Clin Periodontol*. 2009 Mar;36(3):265-77. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01363.x.

Von der Mark K, Park J, Bauer S, Schmuki P. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res*. 2010 Jan;339(1):131-53. doi: 10.1007/s00441-009-0896-5.

Weng D, Hoffmeyer M, Hurzeler MB, Richter EJ. Osseotite vs. machined surface in poor bone quality. A study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Dec;14(6):703-8.

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.

Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Sep;20 Suppl 4:172-84. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x.

Williamson RS, Disegi J, Griggs JA, Roach MD. Nanopore formation on the surface oxide of commercially pure titanium grade 4 using a pulsed anodization method in sulfuric acid. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 Oct;24(10):2327-35. doi: 10.1007/s10856-013-4985-3.

Yamagami A, Nagaoka N, Yoshihara K, Nakamura M, Shirai H, Matsumoto T, et al. Ultra-structural evaluation of an anodic oxidated titanium dental implant. *Dent Mater J*. 2014;33(6):828-34.

Yang W, Hsu ML, Lin MC, Chen ZH, Chen LK, Huang HH. Nano/submicron-scale TiO₂ network on titanium surface for dental implant application. *J Alloy Compd*. 2009;479(1-2):642-47. doi: 10.1016/j.jallcom.2009.01.021

Yang J, Pham SM, Crabbe DL. High-resolution micro-CT evaluation of mid-to-long term effects of estrogen deficiency on rat trabecular bone. *Acad Radiol*. 2003 Oct;10(10):1153-8.

Yao C, Slamovich EB, Webster TJ. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Apr;85(1):157-66.

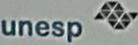
Yeo IS, Han JS, Yang JH. Biomechanical and histomorphometric study of dental implants with different surface characteristics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Nov;87(2):303-11. doi: 10.1002/jbm.b.31104.

Yu X, Li Y, Wlodarski W, Kandasamy S, Kalantar-Zadeh K. Fabrication of nanostructured TiO₂ by anodization: a comparison between electrolytes and substrates. *Sensor Actuat B-Chem*. 2008;130(1):25-31. doi: 10.1016/j.snb.2007.07.076.

Yu WQ, Zhang YL, Jiang XQ, Zhang FQ. In vitro behavior of MC3T3-E1 preosteoblast with different annealing temperature titania nanotubes. *Oral Dis*. 2010 Oct;16(7):624-30. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01643.x.

Zuo J, Huang X, Zhong X, Zhu B, Sun Q, Jin C, et al. A comparative study of the influence of three pure titanium plates with different micro- and nanotopographic surfaces on preosteoblast behaviors. *J Biomed Mater Res A*. 2013 Nov;101(11):3278-84. doi: 10.1002/jbm.a.34612.

ANEXO - Certificado de Comitê de Ética em Pesquisa

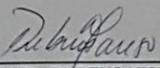
 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Diniz
CEP: 12231-970 - F. (12) 3947-9028
Fax: (12) 3947-9010 / tangon@itige.unesp.br

 **CERTIFICADO**
CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **02/2014-PA/CEP**, sobre
"Influência de diferentes parâmetros de oxidação anódica na
osteogênese e na neoformação óssea em implantes rosqueados de
ti:Estudo experimental em tibiais de coelhos", sob a
responsabilidade da aluna de Pós-Graduação/Doutorado **MARIA
FERNANDA LIMA VILLAÇA-CARVALHO**, tendo como orientadora a
Profa. Dra. Mari Eli Leonelli de Moraes, está de acordo com os
Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho
Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794
de 08/10/2008 e foi aprovado por esta CEUA.

São José dos Campos, 04 de abril de 2014.


Prof.Assist.Dr. RUBENS NISIE TANGO
Coordenador

Obs:- Para este trabalho serão utilizados 10(dez)coelhos, Nova Zelândia, com idade de 5
meses



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia



CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais

São José dos Campos, 26 de fevereiro de 2015

OFÍCIO Nº 03/2015-CEUA-ICT-CSJC-UNESP

Prezado(a)	MARIA FERNANDA LIMA VILLAÇA-CARVALHO
Projeto	INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PARÂMETROS DE OXIDAÇÃO ANÓDICA NA OSTEOGÊNESE E NA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM IMPLANTES ROSQUEADOS DE Ti: ESTUDO EXPERIMENTAL EM TIBIAS DE COELHOS
PARECER	
<p>Por solicitação da Pesquisadora, fica alterado o título do projeto acima mencionado, para " Efeito da nanotexturização de superfície de implantes, obtida por uma nova rota de anodização na osteogênese: Estudo in vivo e in vitro". Convalidando dessa forma o Certificado nº 02/2014-PA/CEP de 04/04/2014.</p>	

Profa.Dra. PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO
Coordenadora

MARIA FERNANDA LIMA VILLAÇA-CARVALHO
Doutoranda em Biopatologia Bucal-Patologia
ICT_CSJC-UNESP