

**Maiolino Thomaz Fonseca Oliveira**

**Avaliação in vitro e in vivo do efeito da cobertura  
de bioossilicato aplicado sobre a superfície de  
titânio durante a osseointegração.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2013

**Maiolino Thomaz Fonseca Oliveira**

**Avaliação in vitro e in vivo do efeito da cobertura  
de bioossilicato aplicado sobre a superfície de  
titânio durante a osseointegração.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

**Orientador:** Prof. Dr. Darceny Zanetta-Barbosa

**Co-orientadora:** Camilla Christian Gomes Moura

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Darceny Zanetta-Barbosa

Prof. Dr. Paulo César Simamoto Júnior

Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Uberlândia, 2013

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maríuza Fonseca Oliveira e José Geraldo Oliveira, que não mediram esforços para que eu alcançasse os meus objetivos. E posso dizer que eles, literalmente, abriram mão de todas as suas vaidades para educar a mim e aos meus irmãos, Bernard Fonseca Oliveira e Gabriela Fonseca Oliveira. Amor é o sentimento que sinto por vocês.

## AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre esteve presente suportando toda a minha vida.

À Aline Arêdes Bicalho pela paciência e tolerância e, principalmente pelo amor e carinho que sempre me ofereceu. Esta conquista é nossa!

Ao Professor Dr. Darceny Zanetta Barbosa pela amizade, orientações, ensinamentos, paciência e pelo exemplo de ser humano. Darceny traduz com exatidão o significado da palavra “Professor”.

A Professora Dra. Camilla Cristhian Moura, pelas valiosas orientações, dedicação e parceria. Obrigado pela oportunidade de trabalhar ao seu lado. Ter você como orientadora deste trabalho foi um privilégio para mim. Obrigado de coração!

Ao Dr. Cirilo de Paula Lima, Médico Veterinário responsável pela anestesia dos animais durante o experimento.

Ao Cléver Ricardo, do Departamento de Materiais Vítreos da Faculdade de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, pela parceria durante a pesquisa.

Aos Professores da Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia, Profa. Iris Malagoni Marquez, Prof. Marcelo Caetano, Prof. Jonas

Dantas, Prof. Lair Mambrini Furtado, Profa. Cláudia Jordão Silva, Profa. Flaviana Rocha Soares, que sempre incentivaram a busca pelo conhecimento, dando total apoio nesta etapa da minha formação.

Aos Residentes do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Átila Roberto Rodrigues e Rodrigo Paschoal Carneiro, Lívia Bonjardim, Luis Gustavo e Dimas, que sustentaram e deram condições para esta caminhada.

Aos Cirurgiões Buco-Maxilo-Faciais, Dárcio Rodrigues, Leandro Zoccoli e Alexandre Aurélio, que sempre apoiaram esta investida.

A Flaviane, Irene e Betânia, pelo apoio e motivação! Vocês são demais. Obrigado pela paciência.

A Graça e Aline, que zelam pelo Programa de Pós-Graduação com carinho.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia e do Hospital de Clínicas que foram educados e tolerantes comigo.

Aos Professores Dr. Miguel Ângelo Ferreira, Dr. Cássio Roberto Rocha dos Santos e Dr. Janir Alves Soares, responsáveis por transformar a minha vida acadêmica, mostrando e fazendo-me acreditar que os meus sonhos eram possíveis. Não tenho palavras para agradecê-los. Vocês foram e sempre serão meus orientadores também.

A Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucurí – UFVJM, onde dei os meus primeiros passos na Odontologia.

Aos meus colegas de Mestrado que, sem dúvidas, sem eles este trabalho não existiria. Meu muito obrigado a vocês e vocês sabem que este trabalho tem a mão de vocês.

Aos amigos Thiago Carneiro (Paulistinha) e Marcel Prudente, irmãos que fiz nessa empreitada.

Aos meus M2, Júlio Bisinotto, Felipe Baires, Jaíba, João Servato, Luisinho da Estomato, Crisnicaw, todos vocês.

Aos veteranos, George Buco Maxilo, Lucas de Natal, João Paulo de Natal, João Paulo Geléia, amigos que fiz para sempre.

Aos Professores Paulo César Simamoto Júnior e Luiz Carlos Gonçalves, parceiros que encontrei nesta empreitada. Admiro-os e vejo em seus olhos a vontade de ensinar e o amor pela odontologia. Espelho-me em vocês!

Aos Professores Dr. Flávio Domingues das Neves e Dr. Carlos José Soares por todo o apoio incondicional e por zelarem com capricho pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>08</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>3. PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>

***RESUMO***

---

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo*, utilizando modelo de implantação em mandíbula de cães, o efeito da incorporação de bioossilicato (vidro bioativo) sobre o processo de neosteogênese por meio do contato osso-implante e, avaliar *in vitro*, utilizando modelo de cultura de células, a influência da incorporação do bioossilicato na superfície rugosa de discos de titânio sobre a adesão e viabilidade celular. Os implantes usados para o estudo *in vivo* (n=32) eram de 10 mm de comprimento e 3,5 mm de diâmetro e conexão cone Morse apresentando superfície tratada com duplo ataque ácido. Metade desses implantes (n=16) recebeu a incorporação de bioossilicato em sua superfície rugosa (Grupo AA+BIO), enquanto a outra metade apenas com superfícies rugosa (n=16) foi utilizada como grupo controle (Grupo AA). As análises *in vitro* utilizaram discos de titânio comercialmente puro grau IV de 8,0 mm de diâmetro por 4,0 mm de altura com as mesmas características dos implantes utilizados nos testes *in vivo*. A avaliação a partir de microscopia eletrônica de varredura revelou que cerca de aproximadamente 25% da superfície dos implantes foi coberta pelo vidro bioativo de forma homogênea. Superfície com duplo ataque ácido associado ao bioossilicato (AA+BIO) também apresentou um menor ângulo de contato ( $\alpha_{10s}=5,3\pm 1,7^\circ$ ) quando comparada com a superfície AA. Os testes de adesão utilizados para verificar a estabilidade das partículas do vidro altamente bioativo incorporado tanto aos discos quanto aos implantes, demonstraram uma adequada estabilidade, não havendo rompimento da interface de união entre a partícula e a superfície de titânio. Os resultados *in vitro*, por meio de cultura de células, demonstraram que a porcentagem de células viáveis aderidas à superfície rugosa coberta com bioossilicato (AA+BIO) foi significativamente menor ( $p < 0,001$ ) do que o grupo com superfície - AA ( $P = 0,004$ ). O teste de viabilidade celular demonstrou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos AA e AA+BIO em nenhum dos períodos analisados. Os resultados histomorfológicos sugerem que a fase inicial do reparo não é afetada pela superfície com AA+BIO quando comparada com a superfície apenas com duplo ataque ácido

**Palavras chave:** Osseointegração, Implantes Dentários, Biovidro.

***ABSTRACT***

---

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate in vivo, using beagle dog model, the effect of incorporation of bioactive glass (highly bioactive glass) on the process of osteogenesis through the bone-implant contact and evaluate in vitro using model cell culture, the influence of the incorporation of bioactive glass the rough surface on titanium discs adhesion and cell viability. The implants used for the in vivo study (n = 32) were 10 mm long and 3.5 mm in diameter and having surface treated with double etching. Half of these implants (n = 16) received the incorporation of bioactive glass on its surface roughened (Group AA + BIO), while the other half only with rough surfaces (n = 16) was used as control group (group AA). The in vitro assays used commercially pure titanium disks grade IV 8.0 mm diameter by 4.0 mm in height with the same characteristics of implants used in in vivo tests. The assessment from scanning electron microscopy revealed that about 25% of the implant surface was covered by highly bioactive glass so homogeneous. Surface double etching associated bioactive glass (AA + BIO) also showed a lower contact angle ( $\alpha_{10s} = 5.3 \pm 1.7^\circ$ ) compared with the AA surface. The adhesion test used to verify the stability of highly bioactive glass particles embedded on both disks as implants, demonstrate adequate stability, with no disruption of the interface bond between the particle and the surface of titanium. The results of in vitro through cell culture, showed that the percentage of viable cells adhered to the roughened surface covered with bioactive glass (AA + BIO) was significantly lower ( $p < 0.001$ ) than the group with surface - AA ( $P = 0.004$ ). The cell viability test showed that there were no statistically significant differences between groups AA and AA + BIO in any of the periods analyzed. The histomorphological results suggest that the initial repair is not affected by surface AA + BIO compared with the surface only with double etching.

**Keywords:** Osseointegration, Dental Implants, Bioglass.

## ***INTRODUÇÃO***

---

## 1. INTRODUÇÃO

A partir do entendimento dos fenômenos associados à osseointegração, a utilização de implantes dentários tornou-se uma das mais importantes alternativas para reabilitação oral na Odontologia. Altos índices de sucessos estão relacionados à implantodontia, fundamentados na sobrevida e longevidade do tratamento com implantes. A manutenção desse sucesso tem sido possível devido à biocompatibilidade do titânio, material utilizado na constituição do implante, com o tecido ósseo. Os fenômenos da osseointegração foram observados pelo Dr. P-I Brånemark, durante um estudo em tíbias de coelho, e a partir disso, uma série de pesquisas foi desenvolvida a fim de se utilizar o titânio como principal constituinte dos materiais de órtese e prótese médica e odontológica<sup>1,2</sup>. Outro importante fator associado à osseointegração é a estabilidade primária conseguida após a inserção do implante no tecido ósseo, garantido a sua imobilização e a consequente regeneração óssea junto a sua superfície. O período de integração entre o tecido ósseo e a superfície do titânio é de aproximadamente 180 dias em osso de baixa densidade, com predominância de tecido ósseo medular, e de aproximadamente 120 dias em osso predominantemente cortical. A fim de acelerar o processo de osseointegração, uma série de modificações na macro, mini e nanoestrutura do implantes tem sido propostas e estudadas em diferentes centros de pesquisas mundiais<sup>3,4,5</sup>. Modificações no desenho do corpo do implante influenciam na sua estabilidade primária de acordo com a densidade óssea do tecido, bem como o tamanho, o número e a distância entre as roscas presentes ao longo do corpo do implante<sup>3,4</sup>. A incorporação de materiais bioativos tais como biovidros, silicatos, cerâmicas, fosfato, cálcio à superfície do titânio, no intuito de aceleração do processo de osseointegração, têm sido discutida e uma série de experimentos realizados na tentativa de antecipar a função dos implantes dentários<sup>5</sup>.

Recentemente, membros do grupo de pesquisa do Departamento de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos – São Carlos, SP, Brasil, desenvolveram um biovidro totalmente cristalino, no sistema Na<sub>2</sub>O–CaO–SiO<sub>2</sub>–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, (Biossilicato, PI 0300644-1) (Zanotto et al. 2004)<sup>6</sup>. Testes *in vitro* demonstraram que o biossilicato contribui diretamente para a aceleração da osteogênese<sup>7</sup>. Estudos envolvendo animais também têm revelado que o biossilicato apresenta um comportamento biológico satisfatório, contribuindo para a formação e manutenção óssea<sup>8,9</sup>. O biossilicato tem se mostrado capaz de promover bons resultados no tratamento da sensibilidade dentinária,

através da formação de uma camada de carbonato de hidroxiapatita sobre a superfície dentinária<sup>10,11</sup>. Estas propriedades biológicas do biossilicato têm estimulado pesquisadores de diversas áreas da odontologia e da medicina a desenvolverem testes tanto *in vitro* quanto *in vivo*, buscando aperfeiçoar cada vez mais a aplicação desta vidrocerâmica nos tratamentos de saúde.

Neste sentido, este estudo tem como proposta avaliar tanto *in vitro*, através de testes de cultura de células, quanto *in vivo*, através de avaliação histomorfométrica de implantes instalados em cães, o efeito da cobertura de biossilicato sobre a superfície rugosa de titânio sobre o processo de osseointegração.

***REVISÃO DE LITERATURA***

---

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

O sucesso clínico dos implantes dentários estimula a busca constante para o aperfeiçoamento e aceleração do processo de reparo osso-implante. Importantes observações tem sido percebidas a partir de mudanças na macro, micro e nano geometria dos implantes<sup>12,13</sup>. A partir da década de 1990, a necessidade de diminuir o tempo clínico de tratamento e melhorar a resposta óssea em torno de implantes para otimizar o tratamento em regiões de qualidade óssea comprometida, fez surgirem os primeiros estudos de modificação da superfície e alteração da rugosidade<sup>14</sup>. A partir destes estudos, o padrão de rugosidade ficou definido baseado em evidências de que uma rugosidade moderada ( $Ra = 0,5 - 2,0\mu m$ ) melhoraria a resposta óssea frente aos implantes dentários, acelerando o processo de osseointegração<sup>15,16</sup>. Além da mudança da rugosidade de superfície, outros trabalhos avaliaram a alteração da forma, embora isto seja muito menos estudado e empregado pelos grandes fabricantes de implante. Implantes com formato de câmara favorecem a melhora da neoformação óssea em torno de implantes dentários<sup>17</sup>.

A rugosidade é o principal parâmetro físico alterado nos implantes, podendo ser realizada por diversos processos industriais. O primeiro processo industrial utilizado foi o plasma *spray* de titânio (PST) produzido através de plasma de titânio em alta temperatura projetado contra o implante, produzindo rugosidade em torno de  $2\mu m$ . Este padrão de rugosidade considerado muito elevado pode favorecer a infecção bacteriana local se exposto ao meio bucal<sup>18</sup>. Os outros processamentos são o ataque ácido, o jateamento com micropartículas, a associação dos dois últimos e a anodização. O ataque ácido é realizado com ácido hidrocloreídrico ou ácido sulfúrico e, além de aumentar a rugosidade, faz uma limpeza seletiva, principalmente quando realizado após o jateamento<sup>19,20</sup>. O jateamento para produção de rugosidade é realizado com a propulsão de micropartículas contra a superfície do implante, as quais podem ser sílica, alumina, dióxido de titânio e cerâmicas absorvíveis<sup>21</sup>. A anodização é outro tratamento que aumenta a rugosidade, através de processo eletroquímico em soluções ácidas fortes, melhorando também a camada de óxido<sup>22</sup>.

A primeira incorporação de biocerâmica na superfície foi através do processo de plasma *spray* de hidroxiapatita (PSHA)<sup>23</sup>, porém, não era nanométrica. Uma boa

resposta biológica foi observada, mas devido à espessura do recobrimento, foram encontradas falhas mecânicas na interface biocerâmica/implante<sup>24</sup>.

Atualmente, a vanguarda nas alterações de superfície é a incorporação de biocerâmicas em escala nanométrica, alterando as propriedades químicas da mesma. As deposições nanométricas são realizadas através de vários processos industriais e evitam a falha mecânica descrita anteriormente. A deposição assistida por feixe iônico (DAFI) deposita uma camada nanométrica de biocerâmica sobre a superfície do implante e resultados preliminares apontam um bom comportamento biológico<sup>25</sup>. Outra maneira de obter deposições nanométricas é a deposição cristalina discreta (DCD) obtida através de imersão dos implantes, após tratamento ácido, em solução com partículas de cálcio e fósforo, também apresentando boa união ao osso<sup>26,27</sup>. Há ainda uma terceira maneira de incorporação em escala nanométrica, o jateamento de partículas biocerâmicas absorvíveis (PBA) e ataque ácido modificado (AAM), estudos preliminares em animais mostram boa biocompatibilidade e altos índices de fixação biomecânica em curtos períodos após a inserção dos implantes<sup>28</sup>.

A utilização de vidros altamente bioativos, através de dissolução iônica controlada, tem sido proposta como fator adjuvante no reparo do tecido ósseo. A diferenciação de osteoblastos tem sido observada na presença de íons dissolvidos, principalmente Si e Ca, promovendo neoformação óssea<sup>29</sup>. Além disso, os biovidros são capazes de apresentar propriedades osteocondutora e alguns tipos também exibem potencial angiogênico<sup>30-32</sup>, bacteriostática<sup>33,34</sup> e anti-inflamatórios<sup>35</sup>.

Embora biovidros tenham sido amplamente testados *in vivo*<sup>8,36-40</sup> apenas algumas aplicações comerciais existem<sup>42</sup>. Isto se deve principalmente devido ao fato do biovidros não apresentar boas propriedades mecânicas, como o titânio, por exemplo. Assim, é comum tentar associar estes dois materiais combinando suas melhores propriedades. No entanto, a associação de superfícies metálicas aos materiais cerâmicos, tais como hidroxiapatita e biovidros, em titânio apresenta problemas inerentes relacionados com a instabilidade interface<sup>41,42</sup>.

***PROPOSIÇÃO***

---

### **3. PROPOSIÇÃO**

Avaliar in vivo e in vitro o efeito da incorporação do bioossilicato à superfícies rugosas de titânio durante o período de osseointegração.

#### **3.1 Objetivos específicos**

Avaliar in vitro, utilizando modelo de cultura de células, a influência da incorporação do bioossilicato na superfície rugosa de discos de titânio sobre a adesão e viabilidade celular.

Avaliar in vivo, utilizando modelo de implantação em mandíbula de cães, o efeito da incorporação de bioossilicato sobre o processo de neosteogênese por meio do contato osso-implante.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os implantes usados para o estudo *in vivo* (n=32) eram de 10 mm de comprimento e 3,5 mm de diâmetro e conexão cone Morse (*Neodent, Curitiba – Paraná, Brasil*), apresentando superfície tratada com duplo ataque ácido. Metade desses implantes (n=16) recebeu a incorporação de biossilicato em sua superfície rugosa (Grupo AA+BIO), enquanto a outra metade apenas com superfícies rugosa (n=16) foi utilizada como grupo controle (Grupo AA). As análises *in vitro* utilizaram discos de titânio comercialmente puro grau IV de 8,0 mm de diâmetro por 4,0 mm de altura com as mesmas características dos implantes utilizados nos testes *in vivo*.

### 4.1- CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

O biovidro usado neste trabalho é derivado de Biossilicato<sup>®</sup>, um vidro cerâmico protegido por dois patentes<sup>6,7</sup>. A composição baseia-se em óxido de cálcio (CaO), (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), de sódio (Na<sub>2</sub>O) e sílica (SiO<sub>2</sub>). O tamanho médio de partícula do pó do VAB é de 49µm.

Utilizou-se um método próprio para o tratamento das superfícies, que inclui um processo para distribuir as partículas sobre a superfície e outro para promover a união das partículas à superfície. A distribuição do biovidro foi feita sobre as superfícies AA de um grupo de implantes e de discos de titânio usados no estudo.

A distribuição de partículas do VAB foi avaliada quantitativamente através de um microscópio eletrônico de varredura e sua fração foi avaliada usando o software de análise de imagem, i. e., Imagem J.

A molhabilidade entre as superfícies dos discos do grupo AA e AA+BIO foi determinada através da mensuração do ângulo de contato. A determinação do ângulo de contato da gota com as superfícies preparadas foi realizada a temperatura ambiente, no sistema medidor de ângulo de contato da Marca KSV (Finlândia), modelo CAM 101. O método utilizado foi a tensiometria ótica com gota estática (gota séssil).

Os recobrimentos sobre implantes não seguiu o mesmo método utilizado para os discos devido às dificuldades inerentes à geometria das amostras e também pelo fato deste primeiro teste não reproduzir a situação real de uso de um implante.

Como o implante dentário é um “parafuso ósseo” utilizamos a norma ASTM F-543: 2007 – (“Test Method for Driving Torque of Medical Bone Screws”) como uma

referência de teste. Com base nessa norma simulamos a inserção do implante, mas em condições de teste mais severas que as reais. Essas condições seriam: (1) teste realizado nos dois sentidos, ou seja, na inserção e na remoção; (2) o processo foi feito à seco e (3) em um material que simula o osso cortical – mais denso.

Os parâmetros desse teste, baseados na norma ASTM F-543:2007 –dizem respeito basicamente à padronização do bloco de teste. Assim os parâmetros foram:

- Material do bloco de teste: poliuretano grau 40 com densidade e propriedades equivalentes ao de um osso cortical. No nosso caso o fornecedor foi a empresa americana Saw Bones ([www.sawbones.com](http://www.sawbones.com)).
- Dimensões do bloco: 100mm de altura por 40mm de diâmetro. A norma sugere que a menor dimensão deve ser maior que 10x o diâmetro nominal do parafuso a ser ensaiado e altura mínima 4,8mm.
- Orifício de inserção do parafuso: condições como indicado pelo fabricante - no nosso caso, fresa de 2mm e 3mm até a profundidade de para um implante de 3,5mm de diâmetro.

### **4.3 - TESTES LABORATÓRIAS**

#### **4.3.1 - Cultura de osteoblastos**

Osteoblastos humanos da linhagem SAOS-2 (Banco de células do Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizados para esta investigação por expressarem marcadores fenotípicos de osteoblastos e mineralizarem sua matriz extracelular. As células foram cultivadas em garrafas de polietileno estéreis contendo meio Eagle modificado por Dulbecco – DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementada com 10% de soro fetal bovino (GibcoLife Technologies, Grand Island, NY, EUA) e antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina) (Invitrogen). As culturas foram mantidas em estufa umidificadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar até atingirem confluência.

Para que o plaqueamento fosse realizado, as células foram soltas do fundo da placa por descolamento enzimático com solução de tripsina e EDTA por 5 minutos a 37°C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 1500rpm a 22°C e o “botão celular” obtido foi ressuspenso em 2 ml de meio de cultura. A densidade celular da suspensão obtida foi estimada por contagem em hemocítmetro de maneira que  $2 \times 10^5$  células/poço

fossem plaqueadas sobre os discos de titânio em placas de poliestireno de 48 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). Cada poço foi completado com 1 mL de meio, sendo que a cada três dias o mesmo era trocado e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase.

Em 4 horas de cultura foi avaliada a adesão celular, Nos períodos de 24, 72 e 120 horas de cultura, foi avaliada a viabilidade celular.

#### **4.3.2 - Determinação da viabilidade e proliferação celulares**

Para ambas as análises foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT-Formazan. Este método é baseado na clivagem do MTT por enzimas mitocondriais de células vivas. Brevemente, de cada poço, 500 µL de meio de cultura foram descartados, restando 500 µL. A atividade enzimática foi determinada adicionando 50 µL/poço de MTT (M-2128, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), na concentração de 5mg/ml, seguida de incubação à 37°C por 4h. Após período de incubação, os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos com 400 µL/poço de dimetil sulfoxido (DMSO, Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Em seguida, o conteúdo de cada poço foi homogeneizado utilizando um micropipetador e uma alíquota de 100µL de cada um foi transferido para poços separados em uma placa de 96 poços (Corning Incorporated).

A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Instrutherm Espectrofotômetro UV-2000A, São Paulo, SP, Brasil) a 570nm. A densidade óptica de cada poço foi proporcional à quantidade de cor, sendo utilizada tanto para determinar o número de células viáveis em cada tempo experimental, quanto para a proliferação dessas células ao longo do tempo. Para todos os tempos experimentais, os testes foram realizados em quadruplicata.

#### **4.3.3 - Adesão celular**

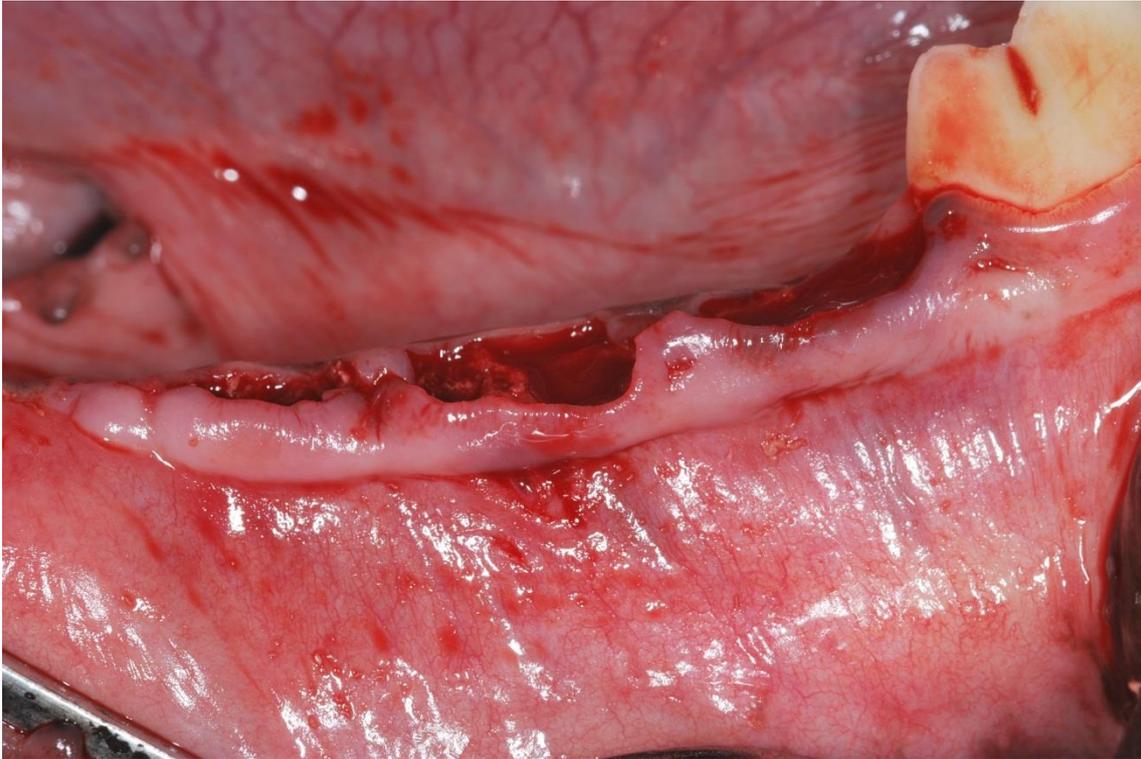
O meio de cultura foi removido 4 horas após o plaqueamento e sobre cada disco foi adicionado 50 µl de tripsina-EDTA. As placas retornaram a estufa e após 5 min foi adicionado 150 µl ao meio para neutralização da enzima. O sobrenadante com as células desaderidas foi removido para contagem do número de células aderidas pelo método de exclusão pelo azul de tripan utilizando câmera de Neubauer. Os resultados foram expressos com porcentagem média de células viáveis aderidas.

### 4.3 – CIRURGIA EXPERIMENTAL

Oito cães adultos machos da raça Beagle com idade entre 18 e 24 meses foram adquiridos para o experimento após a aprovação do comitê de ética animal da Universidade Federal de Uberlândia. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral. Os procedimentos pré-anestésicos contaram com a administração intramuscular de sulfato de atropina (0.044 mg/kg) e cloreto de xilazina (8 mg/kg). A anestesia geral foi conseguida através da injeção intramuscular de cloreto de ketamina (15 mg/ kg). Após a anestesia, foram realizadas as exodontia dos 3 primeiros pré molares bilateralmente. O procedimento envolveu retalho mucoperiosteal total, odontosseção no sentido vestibulo-lingual, individualizando as raízes e facilitando a remoção com elevadores e fórceps. Foi realizada uma limpeza adequando do campo operatório após as extrações e a sutura foi com fio reabsorvível (3-0 Vicryl, Ethicon, Langhorne, PA) (Figuras 1,2,3).



**Figura 1** – Odontosseção para facilitar a remoção dos elementos dentários.



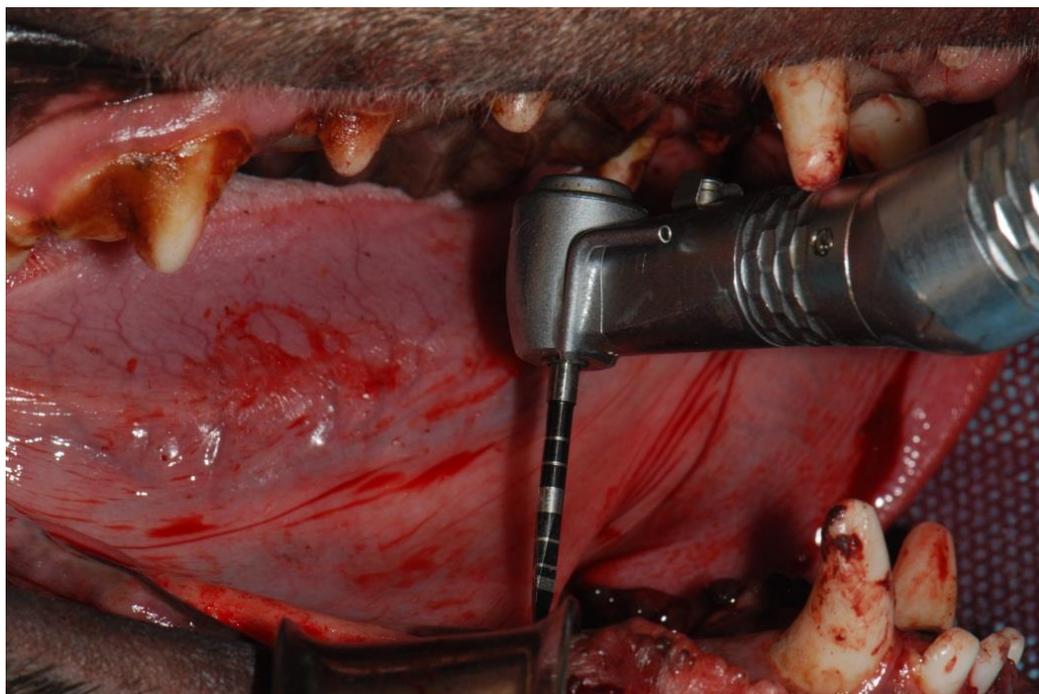
**Figura 2** – Aspecto cirúrgico após as exodontia.



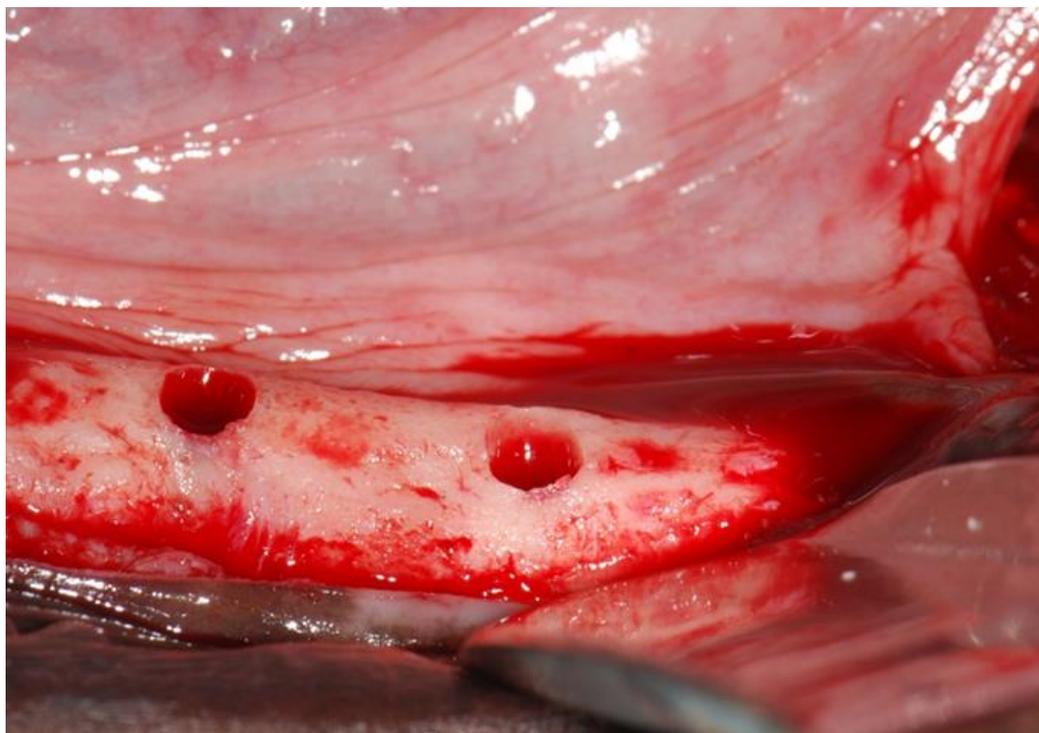
**Figura 3** – Sutura utilizando fio reabsorvível (3-0 Vicryl, Ethicon, Langhorne, PA).

Oito semanas após as extrações, 1 implante do grupo AA e 1 do Grupo AA+BIO, foram instalados no lado direito da mandíbula. Duas semanas após a primeira

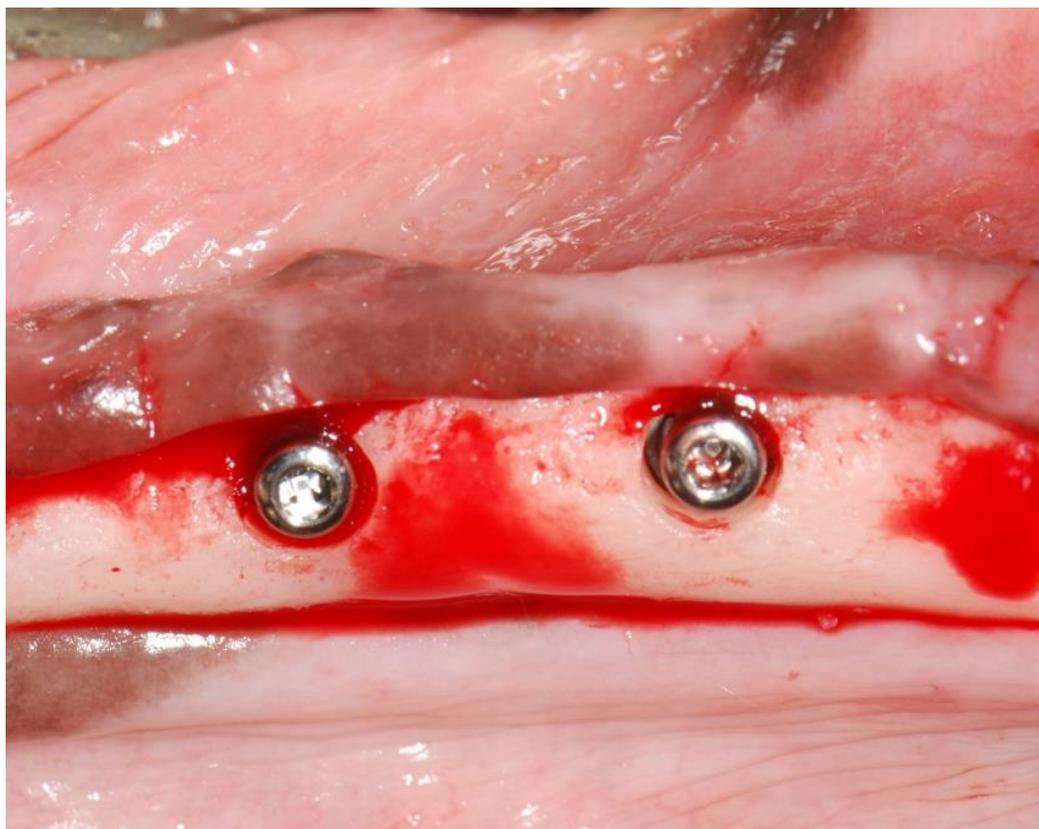
implantação, o mesmo procedimento foi realizado do lado esquerdo da mandíbula Figuras (5,6,7).



**Figura 4** – Realização das perfurações ósseas para instalação dos implantes.



**Figura 5** – Leitões preparados para receber os implantes.

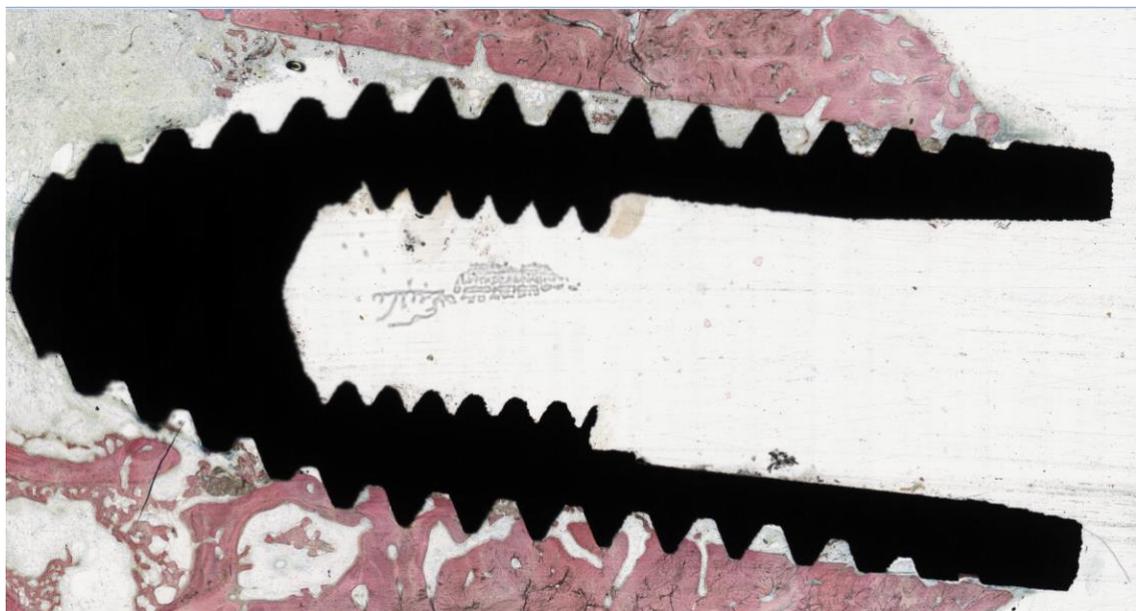


**Figura 6** – Aspecto final após a instalação dos implantes

Os animais foram eutanasiados 4 semanas após a primeira cirurgia de instalação dos implantes e cada cão era portador de implantes com 4 e 2 semanas. Todos os implantes foram instalados seguindo as recomendações do fabricante. A medicação pós-cirúrgica incluiu antibiótico (cefazolina 30 mg/kg com intervalo de 12 h for 3 dias) e antiinflamatório (0.2 mg/kg por durante 3 dias). A eutanásia foi alcançada através da sobredose anestésica. Com auxílio de uma serra, parte do corpo mandibular dos cães foi removida e realizada a dissecação para remoção de todo o tecido mole adjacente. Os espécimes obtidos foram destinados à avaliação histomorfométrica.

O contato osso-implante (%COI) foi determinado através de uma magnificação de 5X-200X (Leica DM2500M, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) por meio de um software computacional (Leica Application Suite, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). As regiões de contato osso-implante ao longo de todo o perímetro do implante foram subtraídas do perímetro total do implante e cálculos foram utilizados para determinar o (%COI). A fração de área ocupada por osso (BAFO) entre as roscas e as regiões de osso trabecular foi determinada em uma magnificação de 100X (Leica DM2500M, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar,

Germany) por meio de um software (Leica Application Suite, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). As áreas ocupadas pelo osso foram subtraídas da área total entre as roscas e cálculos foram realizados para determinar o BAFO (Figura 7).



**Figura 7** – Análise histomorfométrica utilizada para obter os resultados do contato osso- implante medidos a partir de BIC e BAFO.

#### 4.4 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

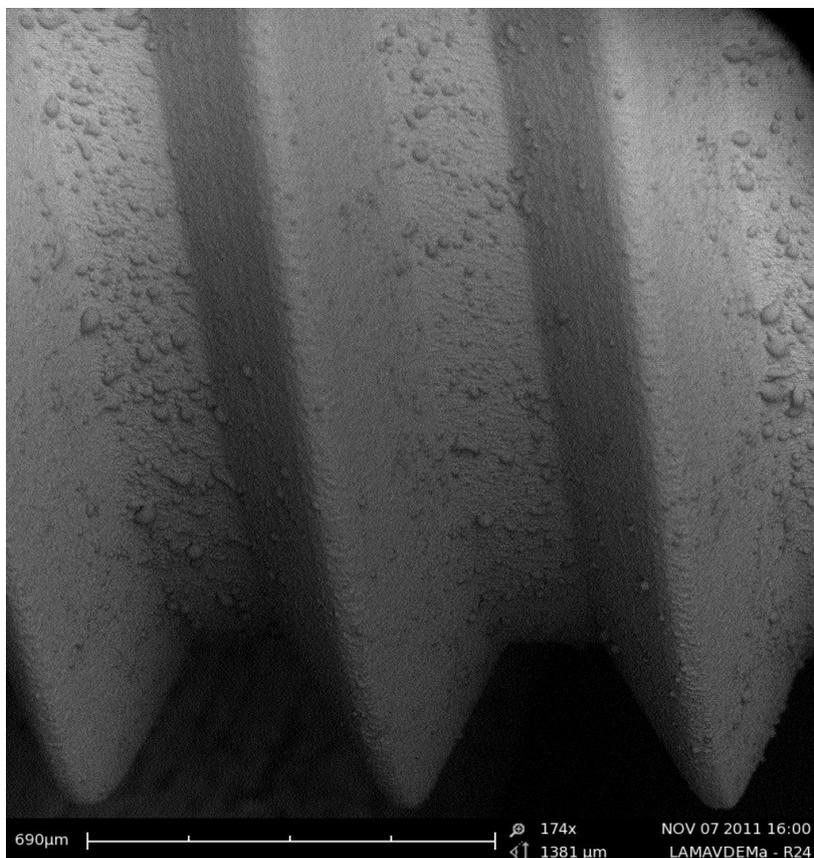
No o estudo in vitro foi aplicado o teste ANOVA plus Dunnet para comparar as diferenças entre o grupo controle e as superfícies Testadas. E para comparação entre as superfícies testadas utilizou-se a análise Kruskall Wallis. A análise estatística dos dados do estudo in vivo foi realizada pelo t-teste pareado de 95% de significância.

## ***RESULTADOS***

---

## 5. RESULTADOS

As superfícies dos implantes tratados com o vidro altamente bioativo foram homogeneamente recobertas. A fração de recobrimento foi de  $25\% \pm$ . Os aspectos finais da superfície estão apresentados na figura 8.



**Figure 8** – Imagens de Microscopia eletrônica de varredura revelando aspectos gerais e representativos da superfície do implante com duplo ataque ácido e incorporação do vidro altamente bioativo.

A molhabilidade dos discos com superfície AA foi de  $\alpha_{10s}=55\pm 4^\circ$  e para os discos com superfície AA+BIO foi de  $\alpha_{10s}=5,3\pm 1,7^\circ$ , evidenciando uma interação diferente entre as superfícies avaliadas. Os valores reduzidos do ângulo de contato observados no grupo AA+BIO revelam uma melhor molhabilidade dessa superfície quando comparada com a superfície AA (Figura 9).

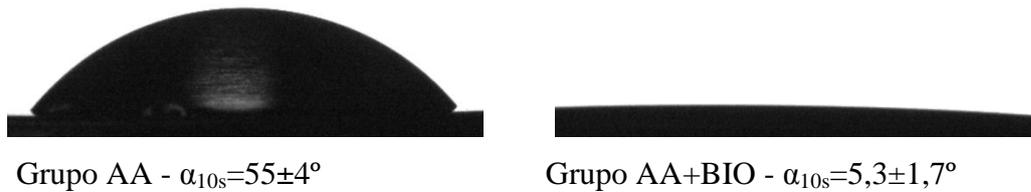


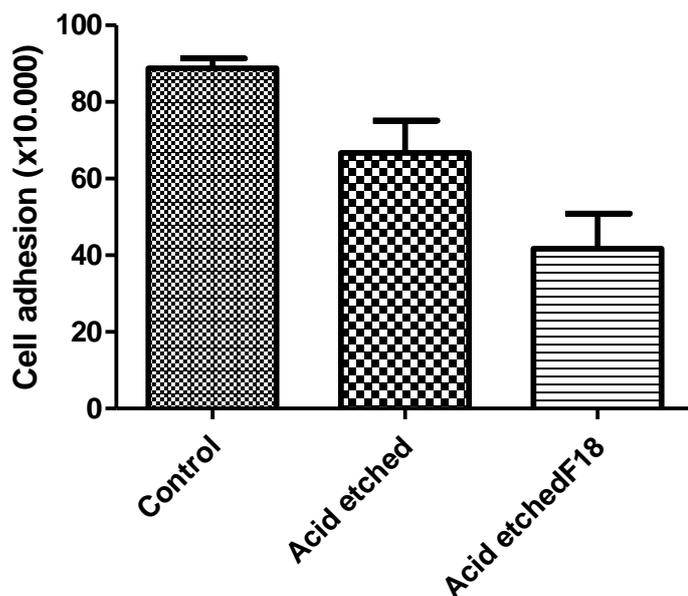
Figura 9 – Os angulos de contato e as interações distintas nos discos entre a superfície AA e AA+BIO .

Os testes de adesão entre as partículas do vidro altamente bioativo e a superfície dos discos mostraram uma adequada interface de união. Embora tenham ocorrido fraturas de algumas partículas, as mesmas se mantiveram unidas as superfícies.

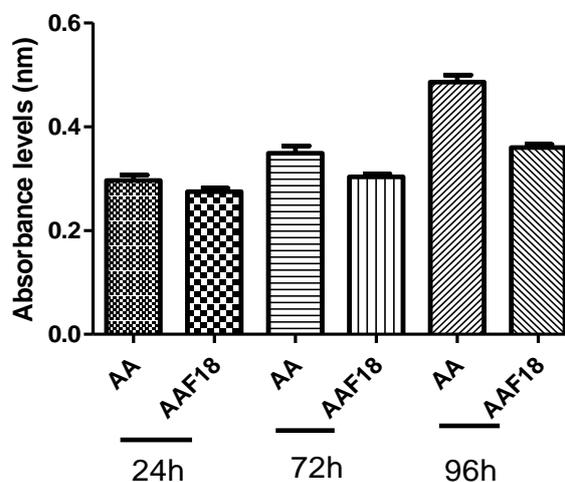
Os testes de inserção e remoção, utilizados para avaliar a adesão do vidro altamente bioativo junto a superfícies do implante revelaram uma adequada estabilidade do biomaterial. Não foram observados destacamentos ou trincas das feições do recobrimento. E com base nesses resultados é possível afirmar que a adesão do recobrimento nos implantes não será afetada pelas condições reais de uso.

### **In vitro**

A percentagem de células viáveis aderidas à superfície rugosa coberta com bio-silicato (AA+BIO) foi significativamente menor ( $p < 0,001$ ) do que o grupo de controle positivo (poliestireno) e do que o grupo com superfície - AA ( $P = 0,004$ , Figura 10). O grupo controle apresentou maiores taxas de viabilidade do que as superfícies de titânio em todos os períodos analisados ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos AA e AA+BIO em nenhum dos períodos analisados. Quando analisado em função do tempo, o grupo de controle apresentou um aumento significativo na viabilidade do dia 1 ao dia 3 e dia 1 ao dia 5 ( $P < 0,001$ ), estabilizando o nível de absorvância entre o dia 3 e dia 5. Nas células cultivadas sobre a superfície AA+BIO a viabilidade foi significativamente aumentada no dia 5, em comparação com o dia 1 ( $P < 0,05$ ), mas manteve-se constante entre o dia 1 e dia 3, e entre o dia 3 e dia 5. Na superfície AA a viabilidade permaneceu constante entre o dia 1 e dia 3, com um aumento significativo no dia 5 ( $P < 0,001$ ), durante o qual as razões de absorvância foram superiores nos dias 1 e 3 (Figura 11).



**Figura 10** – A percentagem de células viáveis aderidas à superfície rugosa coberta com biossilicato (AA+BIO) foi significativamente menor ( $p < 0,001$ ) do que o grupo de controle positivo (poliestireno) e do que o grupo com superfície – AA ( $P = 0,004$ ).



**Figura 11** - O grupo controle apresentou maiores taxas de viabilidade do que as superfícies de titânio em todos os períodos analisados ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos AA e AA+BIO em nenhum dos períodos analisados.

## In vivo

Não houve complicações pós-operatórias e todos os animais evoluíram sem infecção ou intercorrências.

O resultado histomorfométrico não revelou nenhuma diferença significativa para BIC e BAFO entre superfícies de 2 e 4 semanas (Figura 11A – 11B). Apesar de não haver diferenças significativas, foi observada em períodos experimentais, uma melhoria de BAFO em 33,3% para o grupo de AA.

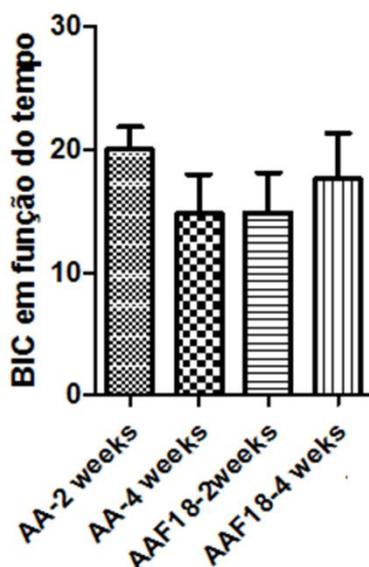


Figura 12A – Os valores de referências revelam que não houve diferença estatística entre as superfícies AA e AA+BIO após a avaliação do contato osso implante através de BIC.

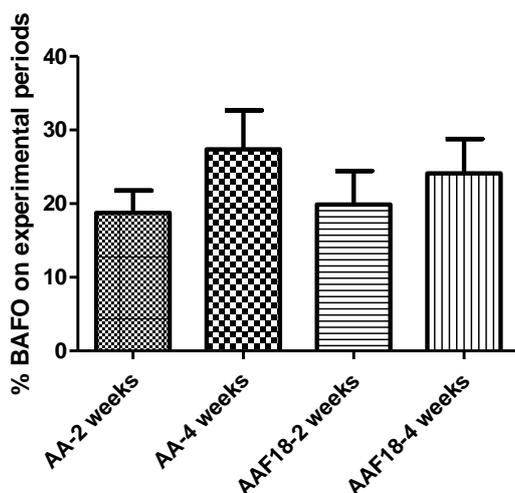


Figura 12B – Não houve diferença estatisticamente significante para a avaliação de BAFO.

## ***DISCUSSÃO***

---

## 6. DISCUSSÃO

A busca pela aceleração da resposta óssea em torno dos implantes dentários tem sido motivada a fim de se antecipar a utilização destes implantes para as funções mastigatórias e estéticas. Nos últimos anos, importantes modificações na superfície dos implantes, através da substituição da superfície lisa por uma superfície com rugosidade moderada, resultaram em significativa melhora da resposta óssea<sup>15,16</sup>.

Modificações químicas, através da incorporação de biomateriais têm sido propostas e a interpretação das alterações está focada na osseotratividade promovida pelo material.

Os resultados *in vivo* desta pesquisa não demonstraram um aumento da formação óssea, após a incorporação do vidro altamente bioativo na superfície rugosa de titânio. Embora a literatura atual suporte as melhorias na resposta biológica observada devido à texturização da superfície do titânio<sup>24,44,45</sup>, o efeito a curto e longo prazo da incorporação de cerâmicas bioativas em superfícies de implantes permanece controverso. A utilização de superfícies bioativas sobre os implantes não expandiu na prática clínica devido à inconsistência no que se refere à composição e espessura dos biomateriais, e também pela dificuldade em se conseguir uma adequada união entre a interface de revestimento e o substrato do implante<sup>24,46,47</sup>. No presente estudo, a técnica utilizada para revestir as superfícies de titânio resultou em uma adequada estabilidade da cerâmica, o que foi confirmado pelo teste de inserção / remoção - testes baseados na norma ASTM F543: 2007 (Especificação Padrão e métodos de teste para os parafusos ósseos metálicos Médica). No entanto, a estabilidade desse revestimento não se reflete num aumento da BIC e BAFO.

O estudo *in vitro* revelou uma melhora significativa em relação à molhabilidade, sendo observada uma importante redução do ângulo de contato após a incorporação do biossilicato sobre a superfície dos discos com duplo ataque ácido. No presente estudo, a porcentagem de cobertura obtida (25%) sobre os implantes pode ter sido insuficiente para promover um aumento nos parâmetros analisados.

Embora pesquisas anteriores demonstrem que o biossilicato seja capaz de estimular a formação óssea<sup>8, 37-40</sup>, estes referidos estudos utilizaram modelos de estudo diferentes, baseando-se no reparo de defeitos ósseos. Além disso, os resultados do estudo *in vitro*, especialmente de adesão celular, pode indicar que o padrão de dissolução do biossilicato pode resultar na baixa adesão celular quando comparado com

as superfícies tratadas com duplo ataque ácido. É importante salientar que a incorporação do bioossilicato não influenciou na viabilidade celular, confirmando sua biocompatibilidade, como demonstrado por estudos *in vitro*. O estudo experimental *in vivo* foi realizado utilizando mandíbulas de cães, o qual é um modelo clássico da literatura para testes com implantes de titânio. No entanto, alguns pontos devem ser salientados nesse estudo. Diferente de pesquisas anteriores com biocerâmicas sobre a superfície de implantes<sup>48-50</sup>, no presente estudo foram utilizados implantes cilíndricos com capacidade expansiva. Esse desenho de implante resultou em um elevado travamento inicial, o que pode ter mascarado o efeito do processo de osteogênese da superfície. Alguns estudos têm utilizado implantes que não apresentam características retentivas, associados com a utilização sobre instrumentação, o que pode ajudar a avaliar as propriedades da superfície do implante, mas isso não simula uma condição clínica. É possível que a densidade e a qualidade óssea, bem como o torque de travamento inicial, possam influenciar nas propriedades do vidro altamente bioativo. Embora a ausência de osseointegração tenha sido observada apenas em alguns cortes histológicos, e a avaliação histomorfológica e a determinação BIC tenham sido realizadas, não é possível determinar a relevância do desenho de implante neste estudo. Segundo Coelho et al., medições BIC só pode ser usada como um indicador de biocompatibilidade e osteocondutividade. Os resultados dessa pesquisa confirmam que o padrão de revestimento testado neste estudo não é citotóxico e não afeta adversamente a formação de novo osso na interface do implante, mostrando resultados comparáveis à da superfície fisicamente modificado - AA. O estudo *in vivo* foi realizado em condições ideais de qualidade e quantidade óssea, e os bons resultados obtidos por ambos os grupos testados pode estar associado a isso. É preciso verificar a influência do recobrimento das superfícies de titânio com o bioossilicato durante o período de osseointegração de implantes testados em osso pobre, de baixa densidade ou com alteração do metabolismo.

## ***REFERÊNCIAS***

---

## REFERÊNCIAS

- 1 - Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconst Surg.* 1969;3(2):81-100.
- 2 - Albrektsson T, Brånemark 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):155-170.
- 3 - Coelho PG, Granato R, Marin C, Teixeira HS, Suzuki M, Valverde GB, Janal MN, Lilin T, Bonfante EA. The effect of different implant macrogeometries and surface treatment in early biomechanical fixation: an experimental study in dogs. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011 Nov;4(8):1974-81.
- 4 - Suzuki M, Calasans-Maia MD, Marin C, Granato R, Gil JN, Granjeiro JM, Coelho. Effect of surface modifications on early bone healing around plateau root form implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Jul;68(7):1631-8.
- 5 - Coelho PG, Granato R, Marin C, Jimbo R, Lin S, Witek L, Suzuki M, Bonfante EA. Effect of Si addition on Ca- and P-impregnated implant surfaces with nanometer-scale roughness: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Mar;23(3):373-8.
- 6 - Zanotto ED, Ravagnani C, Peitl O, Panzeri H, Lara EH (2004). Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable Biosilicates for use in the treatment of oral ailments, WO2004/074199, Fundação Universidade Federal de São Carlos, Universidade de São Paulo, 20 February, Int. C. C03C10/00.
- 7- Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, et al. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). *J Biomed Mater Res A.* 2007 Sep 1;82(3):545-57.
- 8- Roriz VM, Rosa AL, Peitl O, Zanotto ED, Panzeri H, Oliveira PT. Efficacy of a bioactive glass-ceramic (Biosilicate®) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Feb;21(2):148- 55.
- 9 - Azenha MR, Peitl O, Barros VM. Bone response to biosilicates with different crystal phases. *Braz Dent J.* 2010;21(5):383-9.

- 10 - Tirapelli C, Panzeri H, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. *Braz Oral Res.* 2010 Oct-Dec;24(4):381-7. PubMed PMID: 21180956.
- 11 - Tirapelli C, Panzeri H, Lara EH, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. The effect of a novel crystallised bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: a long-term clinical study. *J Oral Rehabil.* 2011 Apr;38(4):253-62.
- 12 - Levin L, Frankenthal S, Zigdon H, Suzuki M, Coelho PG. Novel implant design for initial stability of dental implants inserted in fresh extraction sockets: a preliminary study. *Implant Dent.* 2012 Aug;21(4):302-5.
- 13 - Elias CN, Rocha FA, Nascimento AL, Coelho PG. Influence of implant shape, surface morphology, surgical technique and bone quality on the primary stability of dental implants. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012 Dec;16:169-80.
- 14 - Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. Design and surface characteristics of 13 commercially available oral implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8(6):622-33.
- 15 - Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004;17(5):536-43.
- 16 - Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont* 2004;17(5):544-64.
- 17 - Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(3):251-62.
- 18 - Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000 1998;17:63-76.
- 19 - Giavaresi G, Fini M, Cigada A, Chiesa R, Rondelli G, Rimondini L, Aldini NN, Martini L, Giardino R. Histomorphometric and microhardness assessments of sheep cortical bone surrounding titanium implants with different surface treatments. *J Biomed Mater Res A* 2003;67(1):112-20.

- 20 - Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23(7):844-54.
- 21 - Lacefield WR. Current status of ceramic coatings for dental implants. *Implant Dent* 1998;7(4):315-22.
- 22 - Sul YT, Johansson C, Albrektsson T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. *Int J Prosthodont* 2006;19(4):319-28.
- 23 - deGroot K KC, Wolke JGC, deBieck-Hogervorst JM,. Plasma-sprayed coating of calcium phosphate. In: Yamamuro T HL, Wilson J editor. *Handbook of Bioactive ceramics, vol II, Calcium phosphate and Hydroxyapatite ceramics*. Boca Raton: CRC Press; 1990. p 17-25.
- 24 - Yang Y, Kim KH, Ong JL. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process--an alternative to plasma spraying. *Biomaterials* 2005;26(3):327-37.
- 25 - Coelho P.G., Lemons J.E. IBAD Nanothick Bioceramic Incorporation on Metallic Implants for Bone Healing Enhancement. From Physico/Chemical Characterization to In-vivo Performance Evaluation. . In: ISBN, editor; 2005.
- 26 - Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. *Biomaterials* 2007;28(32):4748-55.
- 27 - Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2007;28(34):5058-67.
- 28 - Marin C, Granato R, Suzuki M, Gil JN, Piattelli A, Coelho PG. Removal Torque and Histomorphometric Evaluation of Bioceramic Grit-Blasted/Acid-Etched and Dual Acid-Etched Implant Surfaces: An Experimental Study in Dogs. *J Periodontol* 2008;79(10):1942-1949.
- 29 - Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Nov;17(11):967-78.
- 30 - Day RM. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Eng*. 2005 May-Jun;11(5-6):768-77.
- 31 - Jell G, Stevens MM. Gene activation by bioactive glasses. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Nov;17(11):997-1002.
- 32 – Hench LL. Genetic design of bioactive glass. *Journal of the European Ceramic Society*, 29, 2009. 1257–1265.

- 33 – Allan I, Newman H, Wilson M. Antibacterial activity of particulate bioglass against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials*. 2001 Jun;22(12):1683-7.
- 34 – Martins CH, Carvalho TC, Souza MG, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Panzeri H, Casemiro LA. Assessment of antimicrobial effect of Biosilicate® against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Jun;22(6):1439-46.
- 35 - Rectenwald JE, Minter RM, Rosenberg JJ, Gaines GC, Lee S, Moldawer LL. Bioglass attenuates a proinflammatory response in mouse peritoneal endotoxemia. *Shock*. 2002 Feb;17(2):135-8.
- 36 - Kido HW, Oliveira P, Parizotto NA, Crovace MC, Zanotto ED, Peitl-Filho O, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro DA, M Renno AC. Histopathological, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of Biosilicate® glass-ceramic scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Aug 31. doi: 10.1002/jbm.a.34360.
- 37 - Brandão SM, Schellini SA, Moraes AD, Padovani CR, Pellizzon CH, Peitl O, Zanotto ED. Biocompatibility analysis of bioglass® 45S5 and biosilicate® implants in the rabbit eviscerated socket. *Orbit*. 2012 Jun;31(3):143-9.
- 38 - Granito RN, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Mochiuti D, Jorgetti V, Driusso P, Peitl O, Zanotto ED, Parizotto NA, Oishi J. In vivo biological performance of a novel highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®): A biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011 Apr;97(1):139-47.
- 39 - Bossini PS, Rennó AC, Ribeiro DA, Fangel R, Peitl O, Zanotto ED, Parizotto NA. Biosilicate® and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Mar;5(3):229-37.
- 40 - Granito RN, Ribeiro DA, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Peitl-Filho O, Zanotto ED, Parizotto NA, Oishi J. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J Mater Sci Mater Med*. 2009 Dec;20(12):2521-6.
- 41 - Hench LL, O A. Bioactive Glasses. In: HENCH, L. L.; WILSON, J. An Introduction to bioceramics. 1. ed. [S.l.]: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., v. 1, 1999. Cap. 3, p. 386. ISBN 981-02-1400-6.
- 42 - Hench LL, West JK. Biological application of bioactive glasses. *Life Chem Rep*. 1996;13:187-241.

- 43 - Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 May-Jun;15(3):331-44.
- 44 - Park YS, Yi KY, Lee IS, Han CH, Jung YC. The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Jan-Feb;20(1):31-8.
- 45 - Ong JL, Carnes DL, Bessho K. Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials*. 2004Aug;25(19):4601-6.
- 46 - Ong JL, Bessho K, Carnes DL. Bone response to plasma-sprayed hydroxyapatite and radiofrequency-sputtered calcium phosphate implants in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002 Jul-Aug;17(4):581-6.
- 47 - Le Geros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Feb;(395):81-98.
- 48 - Coelho PG, Freire JN, Granato R, Marin C, Bonfante EA, Gil JN, Chuang SK, Suzuki M. Bone mineral apposition rates at early implantation times around differently prepared titanium surfaces: a study in beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 Jan-Feb;26(1):63-9.
- 49 - Granato R, Marin C, Gil JN, Chuang SK, Dodson TB, Suzuki M, Coelho PG. Thin bioactive ceramic-coated alumina-blasted/acid-etched implant surface enhances biomechanical fixation of implants: an experimental study in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011 Jun;13(2):87-94. doi: 10.1111/j.1708-8208.2009.00186.x.
- 50 - Bellucci D, Sola A, Gentile P, Ciardelli G, Cannillo V. Biomimetic coating on bioactive glass-derived scaffolds mimicking bone tissue. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Dec;100(12):3259-66. doi: 10.1002/jbm.a.34271. Epub 2012 Jun 26.