



Investigação original

Avaliação *in vitro* do comportamento de osteoblastos sobre implantes com diferentes tratamentos de superfície



Pedro Mesquita^{a,*}, António Felino^b, Helena Raposo^c e Américo Afonso^a

^a Departamento de Anatomia e Histologia Dentária, Faculdade de Medicina Dentária (FMDUP), Porto, Portugal

^b Departamento de Cirurgia Oral, FMDUP, Porto, Portugal

^c Departamento de Farmacologia, FMDUP, Porto, Portugal

INFORMAÇÃO SOBRE O ARTIGO

Historial do artigo:

Recebido a 20 de outubro de 2014

Aceite a 14 de abril de 2015

On-line a 6 de junho de 2015

Palavras-chave:

Cultura de células

Implantes dentários

Osteoblastos

Propriedades da superfície

Microscopia electrónica varrimento

R E S U M O

Objetivo: Avaliar, *in vitro*, o comportamento biológico de células osteoblásticas na presença de diferentes superfícies implantares.

Métodos: Foram utilizados 6 grupos de implantes. Os 2 primeiros formados por implantes maquinados, o terceiro, quarto e quinto por implantes jateados e submetidos a ataque ácido, segundo diferentes protocolos, e o sexto por implantes revestidos a spray de plasma de titânio. Os implantes foram semeados com células de medula óssea humana e cultivados por um período de 33 dias, tendo sido avaliados os seguintes parâmetros: adesão e padrão de crescimento celular por microscopia electrónica de varrimento, morfologia celular através de microscopia confocal de varrimento laser, atividade da fosfatase alcalina, expressão génica de marcadores osteoblásticos e consumo de cálcio ionizado do meio de cultura. Os dados foram analisados com o teste estatístico MANOVA (alfa = 0,05).

Resultados: Não se verificaram diferenças entre os 6 grupos no que se refere à adesão e proliferação celular e à expressão génica de marcadores osteoblásticos. O padrão de crescimento apresentou diferenças com maior grau de complexidade nos implantes dos grupos 3 e 5. A atividade da fosfatase alcalina apresentou, aos 21 dias, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 3, 5 e 6 e o grupo controlo 1. Em relação aos níveis de cálcio ionizado no meio cultura os maiores consumos verificaram-se nos grupos 3, 5 e 6.

Conclusões: A superfície dos implantes parece influenciar o comportamento biológico *in vitro* para o conjunto dos parâmetros analisados, mesmo quando considerados implantes com a mesma designação de superfície, embora preparada segundo protocolos distintos

© 2015 Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondência.

Correio eletrónico: pmesquita@fmd.up.pt (P. Mesquita).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rpem.2015.04.006>

1646-2890/© 2015 Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

In vitro osteoblastic cells behavior evaluation cultured on implant surfaces with different treatments

A B S T R A C T

Keywords:

Cultured Cells
Dental implants
Osteoblasts
Surface Properties
Electron Scanning Microscopy

Objectives: Evaluate the in vitro biological behavior of odontoblastic cells in the presence of different implant surfaces.

Methods: 264 pure titanium implants were divided into six groups. The two first ones were formed by machined implants, the third, fourth and fifth by blast-etched implants, according to different protocols, and the sixth one by plasma spraying coated titanium implants. The six group implants were cultured with human bone marrow cells for a 33-day period to evaluate cell adhesion and proliferation by scanning electron microscopy, cytoskeleton organization by confocal laser scanning microscopy, alkaline phosphatase activity, osteoblast markers gene expression and ionized calcium consumption. Groups of data were evaluated using MANOVA (alfa = 0.05).

Results: No differences were observed in cell adhesion and proliferation and in gene expression of osteoblastic markers. The pattern of growth showed differences with more complexity observed in groups 3 and 5. Alkaline phosphatase activity at 21 days in groups 3, 5 and 6 showed statistically significant differences compared with control group 1. Consumption of ionized calcium from the culture media was higher in groups 3, 5 and 6.

Conclusion: Implant surface seems to influence in vitro biological behavior of osteoblasts even considering implants designate by the same surface treatment although prepared according to different protocols.

© 2015 Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

O titânio é, presentemente, o material mais utilizado na confecção de implantes dentários pelas suas excelentes propriedades, nomeadamente biocompatibilidade e segurança biológica¹⁻³.

As características da superfície dos implantes revelam-se importantes uma vez que é nessa zona que ocorrem as reações biológicas que conduzem, quando as condições são favoráveis, à osteointegração⁴⁻⁶. A microtopografia, nomeadamente a rugosidade, e a composição química superficial são importantes pois podem condicionar a osteogénese, desde as fases moleculares até às fases celulares, devendo ser analisadas sempre que se interpretam resultados referentes ao fenómeno da osteointegração e ao desempenho de implantes^{7,8}. Microtopografia, rugosidade e composição química da superfície estão intimamente interligadas, uma vez que, modificando uma modificam-se as outras. Em certa medida, todas elas são influenciadas pelo tipo de tratamento de superfície.

São várias as técnicas de tratamento de superfície a que podem ser sujeitos os implantes⁹⁻¹¹, podendo ser agrupados em 2 grandes grupos: os que apresentam superfície modificada por métodos de adição e os preparados por métodos de subtração^{9,12}. Para além da melhoria das características, algumas técnicas procuram tornar a superfície do titânio bioativa^{9,13,14}. Uma das formas de o conseguir é recorrendo ao seu revestimento com substâncias do tipo fosfato de cálcio que, devido às suas características e semelhanças com o tecido ósseo, apresentam a vantagem de proporcionar uma melhor e mais rápida ancoragem ao osso¹⁴⁻¹⁶. No presente trabalho analisou-se o comportamento biológico in vitro de

células osteoblásticas quando em contacto com superfícies implantares com diferentes microtopografias.

H0=. o tratamento de superfície dos implantes não influencia a resposta biológica in vitro dos osteoblastos.

H1=. o tratamento de superfície dos implantes influencia a resposta biológica in vitro dos osteoblastos.

Materiais e métodos

Foram utilizados 264 implantes em titânio comercialmente puro (All Spiral, Eckerman, Alicante, Espanha; Stark-D, Sweden Matina, Padua, Itália), de graus III e IV, divididos em 6 grupos: grupos 1 e 2 – implantes maquinados com macrotopografias diferentes, grupos 3, 4 e 5 – implantes submetidos a duplo tratamento, por método de subtração, consistindo primeiramente no jateamento da superfície, com diferentes partículas, seguido de um ataque ácido. A diferença entre estes 3 grupos reside no tipo de partículas e no tipo de ácido utilizado, bem como nas condições de temperatura, pressão e duração de tempo a que foram submetidos os implantes, não tendo essas condições sido reveladas pelos fabricantes. Por fim o grupo 6 formado por implantes revestidos a spray de plasma de titânio (TPS). Os implantes do grupo 5 eram, segundo o fabricante, uma evolução relativamente aos implantes do grupo 4, apresentando o mesmo tipo de tratamento de superfície embora realizado segundo um protocolo distinto, não revelado pelo fabricante. Os implantes dos grupos 1 e 3 apresentavam a mesma macrotopografia, sendo os do grupo 1

maquinados e os do grupo 3 jateados. Quanto aos grupos 2 e 6, os implantes apresentavam as mesmas características macrotopográficas, sendo os do grupo 2 maquinados e os do grupo 6 revestidos a TPS.

Os implantes foram cortados longitudinalmente, no sentido do longo eixo, e transversalmente, tendo os cortes sido realizados com recurso a um disco diamantado montado num micrótopo para tecidos duros não descalcificados (Acutum, Struers, Dinamarca). As amostras obtidas foram submetidas a um processo de limpeza metalográfica, em banho ultrassónico, secas numa estufa (Heraeus Electronic, Gaprüfte Sicherheit, Alemanha), à temperatura de 37 °C, durante 24 horas, e esterilizadas, em mangas individuais, em autoclave (OMRON ESCS, Kyoto, Japão), a uma temperatura de 121 °C e uma pressão de 124 kPa, durante 45 minutos. Os implantes dos 6 grupos foram semeados com células de medula óssea humana e cultivados por um período de 33 dias. As culturas de células osteoblásticas foram estabelecidas a partir de medula óssea humana obtida em procedimentos cirúrgicos ortopédicos programados, em pacientes saudáveis. O comportamento celular foi avaliado, ao longo do tempo de cultura, quanto à adesão celular à superfície dos implantes, à organização do citoesqueleto de F-actina, à morfologia celular e ao padrão de crescimento celular. Foi também avaliada a atividade da fosfatase alcalina, a expressão génica de proteínas da matriz e o consumo de cálcio ionizado (Ca_i) a partir do meio de cultura.

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada numa solução de Triton a 1% pela hidrólise do p-nitrofenilfosfato em tampão alcalino (30 minutos, 37 °C) e determinação espectrofotométrica do p-nitrofenol formado a 405 nm, num leitor ELISA (Denley Wellscan) e comparada com os valores obtidos para uma série de padrões de p-nitrofenol. Os resultados foram expressos em nanomoles de p-nitrofenol produzido por minuto e por micrograma de proteína (nmol/min.µg proteína). Para a avaliação deste parâmetro foram utilizadas 3 amostras dos implantes, pertencentes a cada um dos grupos, por tempo de cultura analisado: 7, 14, 21, 25 e 28 dias, perfazendo um número total de 8 implantes, por experiência, considerando os 5 tempos analisados. Assim, no total, foram utilizados 24 implantes por grupo.

Na avaliação da expressão génica dos marcadores osteoblásticos procedeu-se à extração do ácido ribonucleico (RNA) da camada celular recorrendo ao Mini Kit RNeasy® (QIAGEN, Valência, CA, EUA), de acordo com as instruções do fornecedor. O RNA foi quantificado através da medição da absorvância das amostras, a 260 nm. Meio micrograma do RNA celular total, de cada amostra, foi transcripto inversamente e amplificado (25 ciclos) com o sistema Titan One Tube RT-PCR System (Roche), com uma temperatura de *annealing*, de 55 °C. Os produtos *Reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) foram analisados, num gel de agarose, a 1%. Nesta análise foram utilizados 5 implantes (10 metades), aos 21 dias, por experiência, pertencentes a cada um dos 6 grupos analisados. Foram, assim, utilizados, no total, 15 implantes por grupo.

Os resultados apresentados relativos à atividade da fosfatase alcalina/proteína total e à análise da expressão génica por RT-PCR são a média de 3 experiências separadas.

O consumo de Ca_i do meio de cultura foi determinado utilizando um kit de diagnóstico da Sigma («Sigma Diagnostics

Kit, procedure number 587»). Os resultados foram expressos em milimoles de cálcio ionizado por litro de meio de cultura (mmol Ca_i /l).

Para a observação das culturas celulares em microscopia electrónica de varrimento (MEV) foram utilizados, no total, 3 implantes de cada grupo. Foram utilizadas 2 metades de implante para cada um dos tempos analisados: 3 horas, 24 horas e 28 dias. Para a observação em microscopia confocal de varrimento laser foram utilizados 2 implantes de cada grupo, tendo sido utilizada uma metade para cada um dos tempos de cultura analisados: 7, 21 e 28 dias.

Na análise do comportamento biológico dos implantes foram utilizados um total de 44 implantes pertencentes a cada um dos grupos analisados.

As variáveis atividade da fosfatase alcalina e consumo de Ca_i do meio de cultura foram sujeitas a análise estatística para comparação de resultados entre grupos.

Os resultados quantitativos são apresentados como média ± desvio padrão. A comparação entre grupos de implantes foi avaliada pelo método estatístico MANOVA. Foi fixado um nível de significância estatística de 5%. Na análise estatística foi utilizado o programa informático SPSS (versão 13.0) (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA).

Resultados

O processo de adesão celular foi avaliado nas primeiras 24 horas de cultura através de MEV (fig. 1). As células osteoblásticas demonstraram capacidade para aderir a todas as superfícies analisadas, não se observando, para este tempo, diferenças entre os grupos.

A morfologia celular e a organização do citoesqueleto foram observadas com recurso à microscopia confocal de varrimento laser após coloração imunocitoquímica para o citoesqueleto de F-actina e núcleo. Aos 7 dias já era evidente o início da diferenciação celular, sendo que aos 21 dias essa organização tornou-se mais evidente com todos os grupos a mostrarem fenótipos típicos de células diferenciadas (fig. 2). Nesta fase as células apresentam numerosos prolongamentos citoplasmáticos e extenso contacto celular.

Aos 28 dias de cultura a superfície dos implantes apresentou-se recoberta por uma camada celular (fig. 3). As imagens obtidas através de MEV mostram diferenças no padrão de crescimento celular. Os implantes dos grupos 1 e 2 apresentam uma camada celular distribuída em forma de paliçada e um padrão de crescimento diferente nas 2 vertentes. Os implantes dos grupos 3 e 5 apresentam uma camada celular com um grau de complexidade mais elevado, com as células a emitirem prolongamentos citoplasmáticos e sendo visíveis numerosas estruturas fibrilares. Os implantes do grupo 4 mostram uma camada de células dispostas em paliçada apresentando a mesma disposição nas 2 vertentes. Os implantes do grupo 6 apresentam uma camada de células dispostas aleatoriamente que se adaptam às irregularidades da superfície, estabelecendo numerosos contactos intercelulares.

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada ao longo do tempo de cultura e os resultados são apresentados na figura 4.

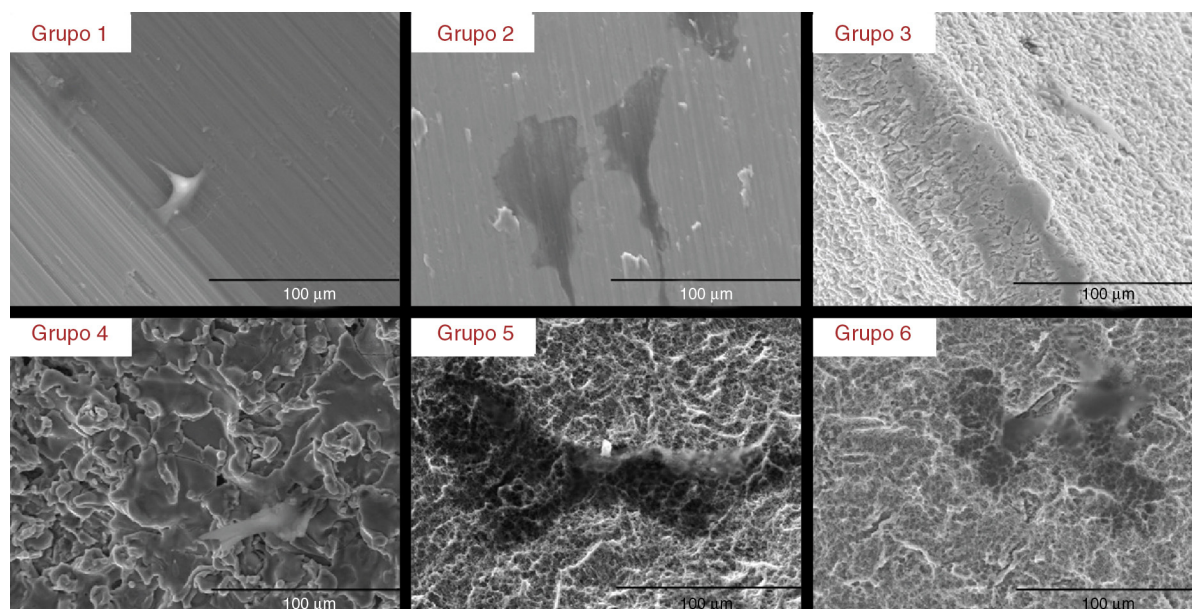


Figura 1 – Morfologia celular às 24 horas de cultura, nas 6 superfícies analisadas. Imagens obtidas por MEV (100 x).

Durante a primeira semana a atividade da fosfatase alcalina revelou-se pouco expressiva para os 6 grupos observando-se um aumento significativo da sua atividade a partir da segunda semana. O pico máximo da atividade foi alcançado aos 21 dias para os implantes dos grupos 3, 5 e 6 e 4 dias depois para os implantes dos grupos 1, 2 e 4. As diferenças observadas, para este tempo, entre os implantes dos grupos 3, 5 e 6 e os implantes do grupo controlo 1, foram estatisticamente significativas (MANOVA [$p < 0,05$]). Para cada um dos grupos os valores começaram a diminuir após este pico (fig. 4).

Observaram-se diferenças com significado estatístico ($p < 0,05$) entre os grupos 4-5 aos 21 dias de cultura e entre o grupo 6 e os grupos 1 e 2 aos 14 e 21 dias de cultura.

Aos 21 dias não se observaram diferenças significativas na expressão génica dos marcadores osteoblásticos analisados (colagénio tipo I, fosfatase alcalina, osteoprotegerina e BMP-2) (fig. 5).

A análise dos implantes colonizados aos 28 dias, através de MEV, revelou a presença de uma camada praticamente contínua de células osteoblásticas contendo depósitos minerais de aspeto globular em associação com a matriz extracelular.

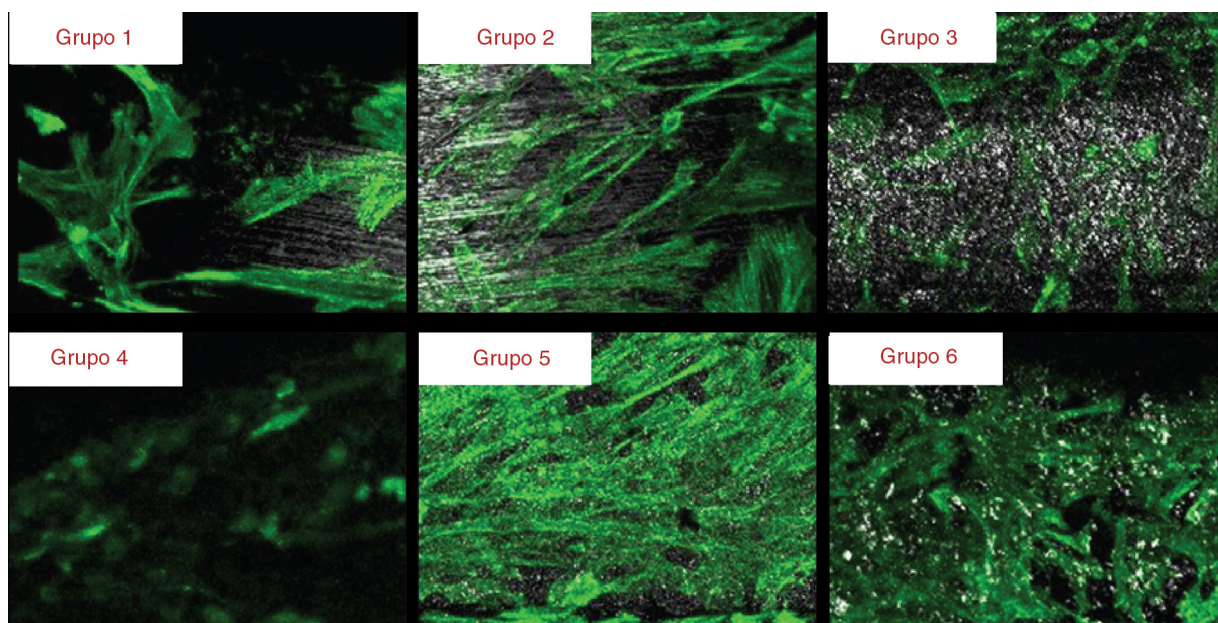


Figura 2 – Morfologia celular aos 21 dias de cultura, nas 6 superfícies analisadas. Imagens obtidas por microscopia confocal de varrimento laser (400 x).

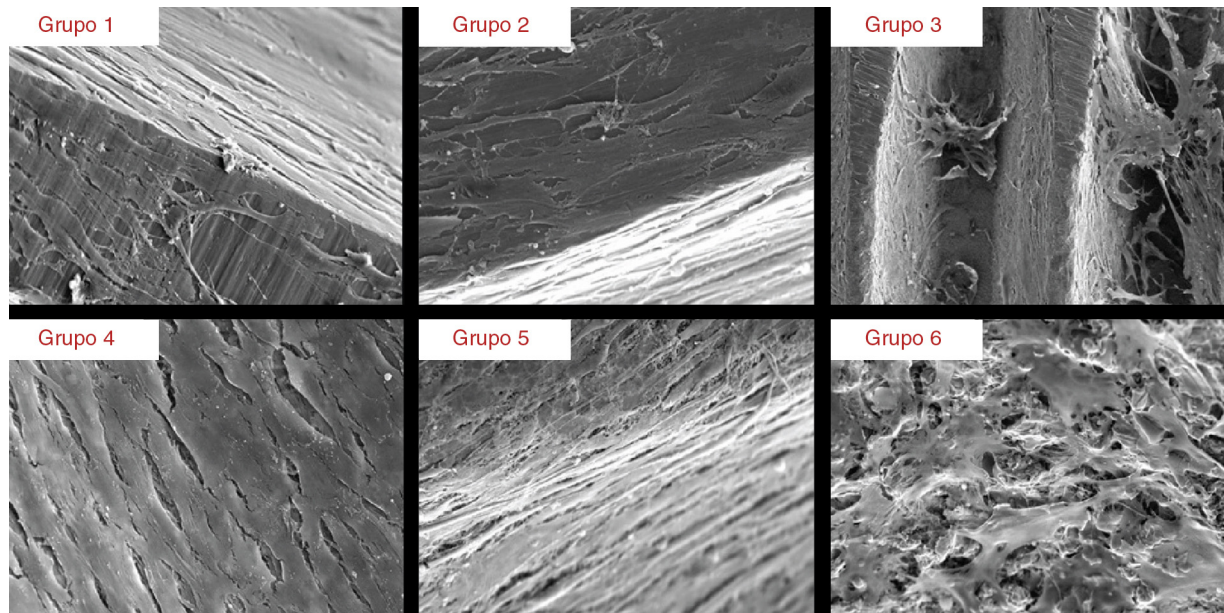


Figura 3 – Padrão de crescimento celular aos 28 dias de cultura. Imagens obtidas por MEV (500 x).

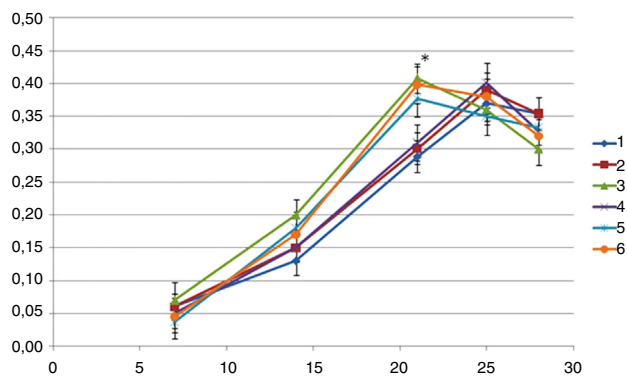


Figura 4 – Atividade da fosfatase alcalina nos 6 grupos de implantes ao longo dos 28 dias de cultura.

Os implantes do grupo 3 parecem revelar uma organização celular mais complexa e maior abundância de depósitos minerais. Em contrapartida, os implantes do grupo 4 mostram a presença de uma camada celular praticamente contínua

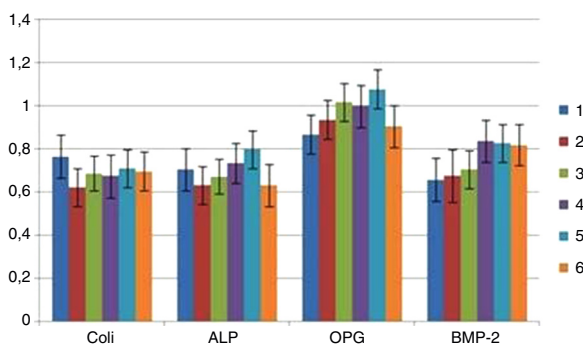


Figura 5 – Expressão gênica de marcadores osteoblásticos, avaliada por RT-PCR, no dia 21 de cultura, nos 6 grupos de implantes.

que parece conter menor número de estruturas globulares (fig. 6).

A avaliação quantitativa do processo de mineralização da matriz foi efetuada através da determinação dos níveis de Ca_i no meio de cultura, ao longo do tempo de cultura (fig. 7). Os valores de Ca_i apresentaram-se elevados e constantes até aproximadamente ao dia 14 para os implantes do grupo 3, até ao dia 16 para os implantes dos grupos 5 e 6 e até ao dia 21 para os implantes dos grupos 1, 2 e 4. A partir destes dias os valores de Ca_i começaram a diminuir até atingirem os valores mínimos que foram alcançados por volta do dia 30 de cultura. Observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), para este parâmetro, entre os grupos 1-3 aos 16, 21 e 25 dias, entre os grupos 4-5 relativamente ao grupo 1 aos 25 dias, entre o grupo 4 e os grupos 1-5 aos 29 dias, e entre o grupo 6 e os grupos 1-2 aos 21 e 24 dias de cultura.

Estes resultados mostram um consumo maior e mais rápido de Ca_i para os implantes do grupo 5 comparativamente com o observado para os implantes dos grupos 1 e 4.

Discussão

Os implantes dentários endo-ósseos têm sido utilizados, com notório sucesso, há mais de 25 anos, com uma grande variedade de materiais e desenhos^{17,18}. A investigação atual centra-se, maioritariamente, na otimização das superfícies implantares com vista a potenciar e acelerar a resposta osteoblástica¹⁹⁻²² e, deste modo, encurtar o tempo de osteointegração. Um dos maiores e mais recentes avanços foi o condicionamento das superfícies, segundo diferentes técnicas, modificando a sua microestrutura^{11,13,21-23}. Sabe-se que a criação de microrugosidades, bem como a incorporação de substâncias bioativas, como por exemplo o fosfato de cálcio, iões cálcio e magnésio ou proteínas ósseas morfogénicas,

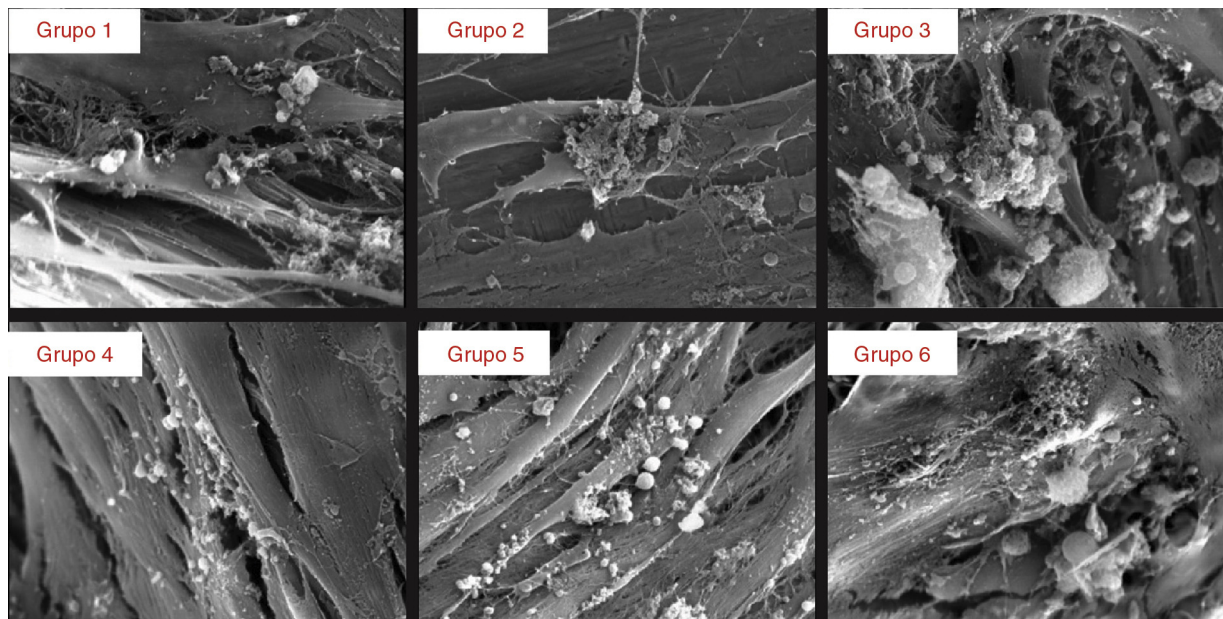


Figura 6 – Imagens obtidas por MEV, em grande ampliação (2.000 x), da camada celular presente na superfície dos 6 grupos de implantes no dia 28 de cultura.

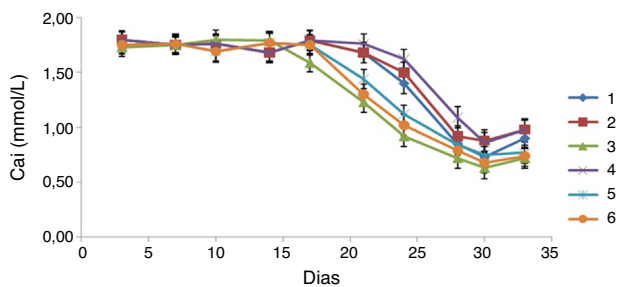


Figura 7 – Evolução dos níveis de cálcio ionizado no meio de cultura ao longo do tempo de incubação (33 dias).

pode acelerar e intensificar a formação óssea ao redor dos implantes^{14,16,24-28}.

Há vários trabalhos, *in vitro* e *in vivo*, que atestam um crescimento mais favorável de células osteoblásticas e a correspondente formação de osso, quando em contacto com superfícies que apresentam rugosidade moderada comparativamente com superfícies lisas ou extremamente rugosas^{25,29-39}.

Neste estudo todos os implantes proporcionaram uma adesão celular semelhante observando-se crescimento celular em todas as superfícies analisadas. Em relação a esta etapa da experimentação *in vitro* não é evidente a influência que as diferentes microtopografias, rugosidades e composição química possam desenvolver, contrariamente ao que sucede *in vivo*, em que essa influência parece ser certa^{40,41}. Aos 21 dias de estudo já foi evidente, mediante técnicas de coloração específicas, a organização do citoesqueleto, começando-se a perceber a influência do tipo de superfície, nomeadamente da rugosidade, sobre o fenótipo celular.

Com este trabalho foi possível verificar que as diferentes superfícies implantares proporcionam condições favoráveis para o crescimento celular, embora com grau e complexidade distintos. Os implantes do grupo 3 apresentaram o padrão de crescimento mais complexo e os implantes do grupo 4 um padrão de crescimento semelhante ao dos implantes maquinados, isto apesar de se tratar de um implante com tratamento de superfície tal como os dos grupos 3 e 5. Nestes 2 últimos grupos foi visível uma grande densidade de contactos focais com a superfície e com outras células mostrando uma melhor organização do citoesqueleto com fibras de actina mais evidentes. Outra observação importante foi a de que implantes com a mesma macroestrutura, mas com tratamentos de superfície distintos (grupos 1 e 3 e grupos 2 e 6), apresentaram diferenças entre si, o que está de acordo com o relatado por Schneider et al.⁴², que verificaram diferença na orientação dos osteoblastos sobre superfícies maquinadas e jateadas refletindo, provavelmente, que a expressão fenotípica destas células é dependente da microtopografia de superfície.

Relativamente à expressão de genes reguladores da osteogénese não foram observadas diferenças significativas, nem evidência de maior expressão para superfícies tratadas relativamente às superfícies maquinadas, ao 21.º dia de cultura, fase em que as células já se encontravam bastante diferenciadas em todas as superfícies. Estes resultados estão de acordo com o obtido por outros autores que verificaram haver um aumento na expressão de diferentes genes associados à osteogénese, não tendo, igualmente, encontrado diferenças significativas entre superfícies maquinadas e superfícies tratadas^{43,44}. A explicação pode ficar a dever-se, por um lado, ao facto de todas as superfícies terem demonstrado proporcionar, desde que mantidas boas condições, a osteointegração e, por outro, porque os níveis de mRNA foram

medidos aos 21 dias, fase em que as células já se apresentavam suficientemente diferenciadas.

O facto de não se terem observado diferenças indicia que todas as superfícies são suscetíveis de induzir a formação óssea e a consequente osteointegração, *in vivo*.

As diferenças mais evidentes, entre as superfícies analisadas, verificaram-se ao nível da quantificação da atividade da fosfatase alcalina e da quantidade de Ca_i consumido a partir do meio, 2 importantes indicadores da osteogénese. As diferenças observadas na quantificação da atividade da fosfatase alcalina são sugestivas da influência da microtopografia da superfície no processo de osteointegração. As superfícies maquinadas mostraram tendência para iniciarem a mineralização da matriz um pouco mais tarde do que as superfícies tratadas, com exceção dos implantes do grupo 4, que revelaram um comportamento muito semelhante ao observado para os implantes maquinados. O pico da atividade da fosfatase alcalina foi atingido mais cedo para os implantes do grupo 5 comparativamente com os implantes do grupo 4 que têm o mesmo tratamento de superfície, embora preparados segundo protocolos diferentes, o que parece confirmar tratar-se de uma evolução relativamente aos implantes do grupo 4. A influência da microtopografia parece ser igualmente confirmada pelo facto de os implantes pertencentes aos grupos 1 e 3 apresentarem diferenças evidentes nos tempos associados ao processo de mineralização, com aparente vantagem para o grupo 3. Também os implantes do grupo 6 demonstraram melhor desempenho comparativamente aos do grupo 2.

A observação do consumo do Ca_i permite reforçar algumas das tendências observadas pela análise da atividade da fosfatase alcalina. O consumo do Ca_i começou ligeiramente antes para os implantes do grupo 3 e um pouco mais tarde para os implantes do grupo 4. Observaram-se diferenças evidentes, com um aparente melhor comportamento biológico dos implantes pertencentes ao grupo 5, em relação aos implantes do grupo 4, o que parece confirmar tratar-se de uma evolução da superfície. Em relação a este parâmetro foi também evidente o melhor desempenho dos implantes do grupo 3 comparativamente aos do grupo 1.

Este estudo apresenta, à semelhança dos outros estudos *in vitro*, a limitação de os resultados obtidos não serem totalmente extrapoláveis para o que acontece *in vivo* na prática clínica e por esta razão devem ser interpretados com algum cuidado.

Conclusões

Neste trabalho confirmou-se que as superfícies com rugosidade média correspondentes a implantes jateados e submetidos a ataque ácido (grupos 3, 4 e 5) foram aqueles que apresentaram os melhores comportamentos biológicos, *in vitro*, para o conjunto dos parâmetros analisados. Outra conclusão que advém deste trabalho é a de que agrupar implantes sob o mesmo tipo de tratamento, sem caracterizar convenientemente as superfícies, sob o ponto de vista topográfico e de composição química, pode ser redutor já que se podem observar diferenças evidentes e significativas na resposta biológica desencadeada.

Responsabilidades éticas

Proteção de pessoas e animais. Os autores declaram que para esta investigação não se realizaram experiências em seres humanos e/ou animais.

Confidencialidade dos dados. Os autores declaram que não aparecem dados de pacientes neste artigo.

Direito à privacidade e consentimento escrito. Os autores declaram que não aparecem dados de pacientes neste artigo.

REFERÊNCIAS

- Ramaglia L, Postiglione L, di Spigna G, Capece G, Salzano S, Rossi G. Sandblasted-acid-etched titanium surface influences *in vitro* the biological behavior of SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Dent Mater J*. 2011;30:183-92.
- Afonso A. Interação entre biomateriais e tecido ósseo. [Tese de Doutoramento]. Faculdade de Medicina Dentária. Universidade do Porto; 1998.
- Steinemann S. Titanium - the material of choice? *Periodontol*. 1998;17:7-21.
- Massaro C, Rotolo P, Riccardis FD, Milella E, Napoli A, Wieland M, et al. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium implants Part I: Chemical composition. *J Mat Sci Mat Med*. 2002;13:535-48.
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomater*. 2000;21:667-81.
- Sader MS, Balduino A, Soares A, Borojevic R. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16:667-75.
- Lim Y, Oshida Y, Andres C, Barco M. Surface characterizations of variously treated titanium materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001;16:333-42.
- Wennerberg A, Albrektsson T. Implant surfaces beyond micron roughness. Experimental and clinical knowledge of surface topography and surface chemistry. *Appl Osseointeg Res*. 2006;5:40-4.
- Bagno A, Bello CD. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mat Sci Mat Med*. 2004;15:935-49.
- Palmer R, Smith B, Howe L, Palmer P. Overview of implant dentistry. In: Palmer R, Smith B, Howe L, Palmer P, editores *Implants in Clinical Dentistry*. Abingdon, Oxon: Informa Healthcare; 2002. p. 7-10.
- Cochran D. A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol*. 1999;70:1523-39.
- Juodzbaly G, Sapragniene M, Wennerberg A, Baltrukonis T. Titanium dental implant surface micromorphology optimization. *J Oral Implantol*. 2007;33:177-85.
- 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;17:536-43.
- Sul Y-T, Jeong Y, Johansson C, Albrektsson T. Oxidized, bioactive implants are rapidly and strongly integrated in bone. Part I - Experimental implants. *Clin Oral Impl Res*. 2006;17:521-6.
- Vercaigne S, Wolke J, Naert I, Jansen J. Bone healing capacity of titanium plasmas sprayed and hydroxylapatite-coated oral implants. *Clin Oral Impl Res*. 1998;9:261-71.

16. Jeffcoat M, McGlumphy E, Reddy M, Geurs N, Proskin H. A comparison of hydroxyapatite (HA)-coated threaded, HA-coated cylindrical, and titanium threaded endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:406-10.
17. Stanford C. Application of oral implants to the general dental practice. *JADA.* 2005;136:1092-100.
18. Binon P. Implants and components. Entering the new millennium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15:76-94.
19. Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. *Periodontol.* 2000;47:15-26.
20. Wennerberg A. Searching for the right surface. *Forum Implantol.* 2006;2:10-3.
21. Geurs N, Jeffcoat R, McGlumphy E, Reddy M, Jeffcoat M. Influence of implant geometry and surface characteristics on progressive osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17:811-5.
22. Weber H. The ITI story of rough implant surfaces. *Forum Implantol.* 2006;2:6-9.
23. Tadorelli M, Jobin M, François P, Vaudaux P, Tonetti M, Szmukler-Moncler S, et al. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (I) Surface characterization. *Clin Oral Impl Res.* 1997;8:208-16.
24. Sul Y-T, 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;19:319-29.
25. Capilla M, Olid M, Olmedo M. Cylindrical dental implants with hydroxyapatite- and titanium plasma spray-Coated surfaces: 5-year results. *J Oral Implantol.* 2007;33:59-68.
26. Sul Y-T, Johansson C, Byon E, Albrektsson T. The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. *Biomater.* 2005;26:6720-30.
27. Sul Y-T, Johansson C, Albrektsson T. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17:625-34.
28. Sul YT, Byon ES, Jeong Y. Biomechanical measurements of calcium incorporated oxidized implants in rabbit bone: Effect of calcium surface chemistry of a novel implant. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2004;6:101-10.
29. Cooper L, Masuda T, Whitson W, Yliheikkilä P, Felton D. Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayd titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:37-47.
30. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Impl Res.* 1998;9:11-9.
31. Conserva E, Menini M, Ravera G, Pera P. The role of surface implant treatments on the biological behavior of SaOS-2 osteoblast-like cells. An in vitro comparative study. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24:880-9.
32. Mustafa K, Lopez B, Hultenby K, Wennerberg A, Arvidson K. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO₂ particles—A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Impl Res.* 1998;9:195-207.
33. Guizzardi S, Galli C, Martini D, Belletti S, Tinti A, Raspanti M, et al. Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. *J Periodontol.* 2004;75:273-82.
34. Conserva E, Lanuti A, Menini M. Cell behavior related to implant surfaces with different microstructure and chemical composition: An in vitro analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25:1099-107.
35. Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez B, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Impl Res.* 2001;12:515-25.
36. Rosa A, Beloti M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. *Braz Dent J.* 2003;14:16-21.
37. Boyan B, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran D, Szmuckler-Moncler S, et al. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 α ,25-(OH)₂D₃. *J Biomed Mater Res.* 1998;39:77-85.
38. Singh RG. Evaluation of the bioactivity of titanium after varied surface treatments using human osteosarcoma osteoblast cells: An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26:998-1003.
39. Aybar B, Emes Y, Atalay B, Tanrikulu S, Kaya AS, Issever H, et al. The influence of titanium surfaces in cultures of neonatal rat calvarial osteoblast-like cells: An immunohistochemical study. *Implant Dent.* 2009 Feb;18:75-85.
40. Zreiqat H, Howlett C. Titanium substrata composition influences osteoblastic phenotype: *In vitro* study. *J Biomed Mat Res.* 1999;47:360-6.
41. Cassinelli C, Morra M, Bruzzone G, Carpi A, Santi GD, Giardino R, et al. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 2 In vitro experiments. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18:46-52.
42. Schneider G, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Differentiation of preosteoblasts is affected by implant surface microtopographies. *J Biomed Mater Res.* 2004;69:462-8.
43. Schneider G, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, et al. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res.* 2003;82:372-6.
44. Masaki C, Schneider G, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Impl Res.* 2005;16:650-6.