

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente a
partir de 09/03/2024.



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 oseointegração 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 reecontrá-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 osseointegração 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 osseointegração. 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-difeniltetrazoliol]. 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-difeniltetrazolol]. 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.

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, Broggini 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, Piatelli 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.

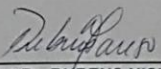
ANEXO - Certificado de Comitê de Ética em Pesquisa

unesp  **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) 3943-9010 / tangon@itg.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 tit: ESTUDO EXPERIMENTAL EM TIBIAS DE COELHOS
PARECER	
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.	

Profa.Dra. PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO
Coordenadora

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