



Dr. Fábio J. B. Bezerra

Doctorado en Biotecnología. Facultad de Odontología de Ribeirão Preto. Universidad de San Pablo (Brasil).

Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

Doctorado en Periodoncia. Facultad de Odontología de Ribeirão Preto. Universidad de San Pablo (Brasil).

Dr. Sergio Henrique Lago Martins

Doctorado en Periodoncia. Facultad de Odontología de Ribeirão Preto. Universidad de San Pablo (Brasil).

Dr. Luis Nantes

Máster en Implantología. Universidad São Leopoldo Mandic. San Pablo (Brasil).

Dr. Manuel Díaz Lanciego

Profesor Adjunto en Universidad CEU San Pablo MD, DDS, MSc, PhD. Madrid (España).

Dr. Antonio Bowen Antolín

Doctor en Medicina y Odontología, Universidad Complutense de Madrid. Médico y Odontólogo. Fellow European Board Oral Surgery. Director del Máster de Implantología y Periodoncia Universidad Isabel I. Madrid (España).

Dr. Juan José Soleri Cocco

Doctor Cum Laude Facultad Medicina Universidad Complutense de Madrid. Odontólogo, Universidad Nacional de Córdoba. Especialista en Cirugía y Traumatología Oral y Maxilofacial. A.O.A. Soc. Arg. de C.B.M.F. Arg. Máster en Implantología y Rehabilitación Oral, Colegio de Médicos Estomatólogos y Cirujanos Maxilofaciales. Paris (Francia). Postgrado en Implantología y Periodoncia, NY University (EE. UU.) Fellow European Board Oral Surgery. Madrid (España).

NUEVAS SUPERFICIES BIOMIMÉTICAS EN IMPLANTOLOGÍA

Beneficios clínicos

RESUMEN

Actualmente, existe un esfuerzo constante en el desarrollo de superficies que aceleren y potencien el proceso de osteointegración. Esclarecer la fisiología de la curación ósea ha llevado a los investigadores a diseñar superficies de implantes que imitan de cerca las características óseas naturales. Este artículo proporciona una descripción general completa de las modificaciones de la superficie que alteran beneficiosamente la topografía, la hidrofiliabilidad y el recubrimiento externo de los implantes dentales para mejorar la osteointegración en huesos sanos y comprometidos, presentando la literatura *in vitro* e *in vivo* de una superficie nano-recubierta con cristales de hidroxiapatita (HANANO®). Los resultados de los estudios científicos respaldan el uso clínico de esta superficie, que proporciona una rehabilitación de pacientes altamente exitosa y tasas de supervivencia predecibles, incluso en con-

diciones clínicas desafiantes.

Palabras clave: implantación dental; osteointegración; superficies biomiméticas, implantes dentales.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los implantes osteointegrados han sido ampliamente utilizados en Odontología para restaurar edentulismos totales, parciales o únicos (1), impactando en la calidad de vida de un número creciente de pacientes en todos los continentes.

Aunque la investigación sobre macrogeometrías, materiales y técnicas de implantes dentales ha aumentado en los últimos años y se espera que se amplíe en el futuro, aún queda mucho por hacer en el uso de mejores biomateriales, geometrías de implantes, modificación de superficies y funcionalización para mejorar los resultados a largo plazo (2), especialmen-

te en situaciones de mayor riesgo de tratamiento, como casos clínicos complejos, pacientes con alteraciones sistémicas y con potencial de respuesta curativa comprometida. Para aumentar la tasa de éxito de los implantes dentales, la investigación se ha centrado en un mejor conocimiento y control de las propiedades de la superficie, como la topografía, la rugosidad y la nanoactivación, así como la respuesta generada por la interacción del biomaterial con el medio ambiente a nivel molecular y nivel celular (3-5).

Específicamente, se incluyen funciones a nivel de micrómetros para mejorar la osteointegración o el contacto directo entre el hueso y el implante (6, 7),

con superficies moderadamente rugosas (1,0 a 2,0 micrómetros) que han demostrado resultados de cicatrización superiores en comparación con superficies mínimamente rugosas (0,5 a 1,0 micrómetros) o áspero (más de 2,0 micrómetros) (8, 9). La nanotopografía sugiere que es muy importante para las etapas iniciales del proceso de osteointegración, regulando los mecanismos de fosforilación y adsorción de proteínas (10-12), además de incrementar la neoformación ósea *in vivo* (13). Además, se sabe que las superficies nanotexturizadas, no solo mejoran la formación ósea, sino que también fortalecen sus propiedades biomecánicas(14). **(Figuras 1-3).**

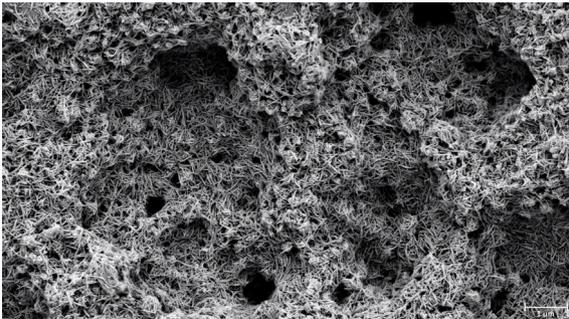


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido con un aumento de 100 000 X que demuestra nanocristales de hidroxiapatita con tamaño, forma y distribución similares a los del hueso humano para generar biomimética tisular. (Superposición de HAnano, Promimic, Gotemburgo, Suecia, sobre Epikut Plus Implant, S.I.N. Implant System, São Paulo, Brasil).

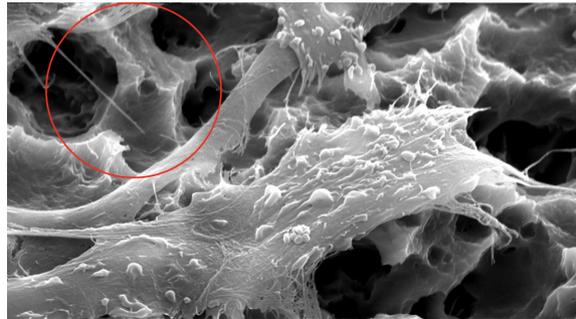


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido a 40.000 X de aumento que demuestra la extensión de la precélula osteoblástica (detalle en el círculo rojo) hacia el recubrimiento nanométrico con hidroxiapatita, que estimula y acelera el proceso de osteointegración.

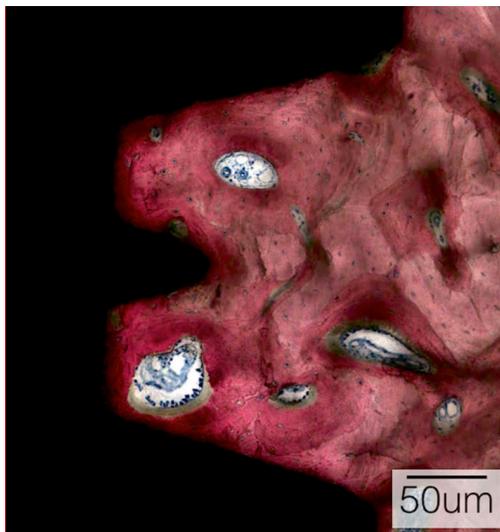


Figura 3. Imagen histológica que demuestra el proceso de osteointegración estimulado por la macro geometría del implante con cámaras de cicatrización, microtexturizado y con superficie biomimética nanoestructurada (Implante Unitite, S.I.N. Implant System, São Paulo, Brasil).

Entre los desafíos de la osteointegración en el campo de la Odontología se pueden destacar los tratamientos de alta complejidad, en los que suele existir un mayor riesgo para el éxito de la terapia, debido a la comprometida respuesta de cicatrización del huésped, ya sea por limitaciones sistémicas o locales (15). De acuerdo con este escenario, promover es-

tímulos positivos para mejorar la respuesta de cicatrización ósea es vital para el éxito del tratamiento, y el conocimiento profundo de la respuesta biológica que rodea al material implantado es fundamental, ya que la superficie es el primer componente con el que interactuar el implante y el huésped (16-18). (Figuras 4-10).

Figura 4. Fotografía clínica inicial que demuestra la ausencia del incisivo central superior con planificación para la colocación del implante con alta estabilidad primaria para la técnica de carga inmediata.



Figura 5. Imagen que demuestra el implante con macrogeometría híbrida con roscas en soporte invertido para carga inmediata. Detalle del implante microtexturizado con doble grabado al ácido (en gris) y el implante que recibe el nano-recubrimiento de hidroxiapatita (dorado). Implantes Epikut y Epikut Plus (S.I.N. Implant System, São Paulo, Brasil).



Figura 6. Fotografía clínica que muestra la instalación quirúrgica del implante.

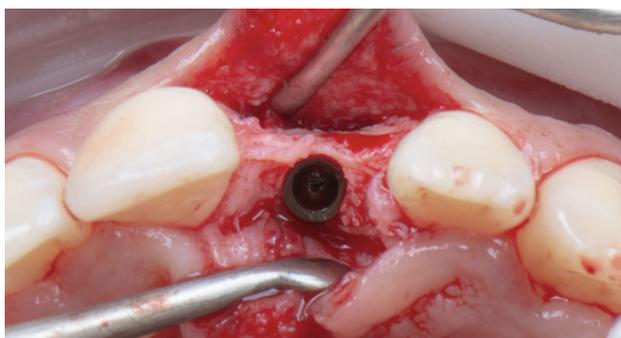


Figura 7. Implante instalado y al que se le realizará una técnica de manipulación del tejido vestibular para mejorar el perfil de emergencia.



Figura 8. Prótesis temporal instalada para definir el perfil de emergencia y composición estética.



Figura 9. Aspecto clínico después de 90 días que demuestra un buen contorno y salud del tejido periimplantario.



Figura 10. Prótesis definitiva instalada. Cortesía: Dr. Felipe Moura Araújo. Belo Horizonte, San Pablo (Brasil).

El proceso de osteointegración generalmente se evalúa por su resultado clínico, que ocurre en la fase de cicatrización tardía, y la mineralización ósea está precedida por una cadena de eventos moleculares, celulares y tisulares que impactarán significativamente en la previsibilidad y calidad de la respuesta del entorno a la biomaterial implantado (9). El primer paso en esta respuesta a los implantes implica la adsorción de proteínas, lípidos, azúcares e iones específicos, estableciendo un recubrimiento orgánico responsable de guiar el funcionamiento celular circundante, lo que lleva a la activación de genes específicos de manera biomimética. Aunque las estructuras nanométricas son factores potenciales para la osteointegración, las interacciones interfaciales detalladas con las células osteogénicas no se han abordado por completo.

Para comprender estas interacciones, estudios previos han explorado la investigación de la señal-

“ ESTUDIOS EN EL ÁREA DE LA BIOTECNOLOGÍA ENFOCADOS EN EL CAMPO DE LOS IMPLANTES DENTALES HAN APUNTADO ESTRATEGIAS QUE PUEDEN REDUCIR EL TIEMPO DE REHABILITACIÓN DE PACIENTES QUE PADECEN EDENTULISMO

zación celular (4, 11, 12, 16, 19-25), centrándose en la evaluación del mecanismo molecular que regula la adhesión de osteoblastos sobre diferentes superficies de biomateriales para establecer un mapa de señalización de proteínas capaz de guiar el desarrollo de nuevos materiales biomédicos, como la señalización de Erk MAPK y la implicación de FAK/Src.

La señalización de Erk MAPK juega un papel crítico en el desarrollo del esqueleto (26, 27), con su eje Ras/Raf/Mek/Erk siendo activado por varios estímulos en las células eucariotas, transduciendo seña-

les extracelulares al interior de las células y coordinando respuestas celulares específicas (28). Además, las activaciones de Focal Adhesion Kinase (FAK) y Src están involucradas en la señalización celular después de la activación de la integrina, y se sugieren como biomarcadores de la interfaz célula/biomaterial que explican la razón de los resultados superiores de las superficies biomiméticas (nanoactivadas) cuando se comparan a superficies maquinadas o microtexturizadas (**Figuras 11 y 12**).

La asociación de diferentes metodologías utiliza-

Figura 11. Mecanismos intracelulares resultantes de la adhesión celular. Las integrinas unen el medio extracelular con el citoesqueleto de la célula. Después de capturar señales extracelulares, las integrinas movilizaron moléculas de señalización al punto de adhesión focal. El equilibrio de la fosforilación de FAK, Src y paxilina y, al final de esta cascada, la cofilina conducirá a una señal intracelular que será responsable del reordenamiento de los filamentos de actina. Estos cambios en el citoesqueleto son responsables de las adaptaciones celulares a diferentes superficies. Fuente: Zambuzzi et al., 2011.

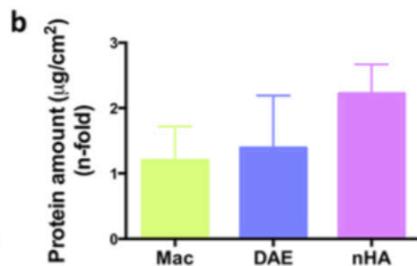
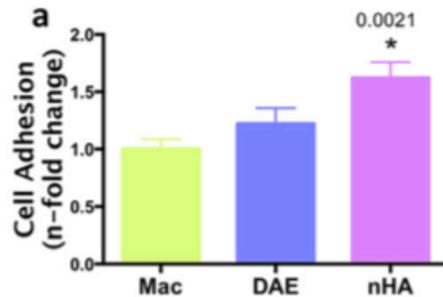
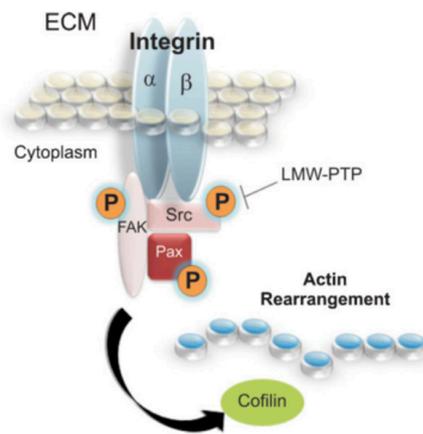


Figura 12. Análisis estadístico que demuestra una mayor concentración de proteína y adhesión celular en superficies biomiméticas en comparación con superficies maquinadas o microtexturizadas.

das actualmente tiene como principal objetivo mejorar la osteointegración, concepto probado en Odontología desde hace décadas, habiendo sido descrito inicialmente por Brånemark, Adell (29) como la unión estructural y funcional directa entre el hueso y la superficie de titanio, visto a nivel de microscopía óptica. Este anclaje óseo del implante debe ocurrir sin la presencia de tejido fibroso en la interfaz hueso-implante. Se establecieron seis factores primarios para que ocurra la osteointegración: el material, el diseño y la superficie del implante, el tipo de hueso de la región, la técnica quirúrgica y la carga aplicada (30).

Desde su desarrollo inicial, los implantes dentales están sufriendo cambios en su morfología, forma y dimensiones. Con el fin de acelerar el proceso de osteointegración y lograr un mejor contacto hueso-implante, se propusieron modificaciones en las superficies de los implantes, que se denominan tratamientos superficiales (31) y se clasifican en tratamientos por adición (electroquímica, plasma de titanio e hidroxiapatita), sustracción (grabado ácido, chorreado abrasivo, láser) y/o asociación entre técnicas (32). Se han centrado esfuerzos considerables en buscar un tiempo de tratamiento reducido con implantes osteointegrados. Para ello se han investigado cambios a escala micrométrica y, más recientemente, a escala nanométrica (33).

La modificación de la superficie del implante permite reducir el tiempo de carga tras la cirugía, acelerando el crecimiento y la maduración ósea, obteniendo un crecimiento óseo directamente sobre la superficie del implante, evitando la interposición de capas de proteínas amorfas, obteniendo una mayor área de osteointegración y atrayendo las células presentes en la neoformación ósea, permitiendo una mayor retención del coágulo (34). Así, las superficies de los implantes de titanio se pueden clasificar en los siguientes grupos: maquinadas, macrotexturizadas, microtexturizadas, nanotexturizadas o biomiméticas (35).

Una superficie con un adecuado grado de rugosidad tiene mayor contacto hueso-implante (BIC) y mayores valores de torque requeridos para retirar el implante (34). Se han empleado varias técnicas de tratamiento de superficies, como el tratamiento con ácido, que se utiliza para descontaminar la superficie de Ti, modificando sus propiedades fisicoquími-

“ ESCLARECER LA FISIOLÓGIA DE LA CURACIÓN ÓSEA HA LLEVADO A LOS INVESTIGADORES A DISEÑAR SUPERFICIES DE IMPLANTES QUE IMITAN DE CERCA LAS CARACTERÍSTICAS ÓSEAS NATURALES

cas (36, 37). Adicionalmente, se utilizan tratamientos prolongados con peróxido de hidrógeno para promover la deposición de apatita en la superficie del Ti, aumentando su bioactividad (38). El ácido sulfúrico (H_2SO_4) combinado con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se ha utilizado para controlar la desoxidación/reoxidación química de materiales a base de titanio. Luego se produce una superficie libre de contaminantes, proporcionando la formación de una capa de óxido, lo cual es un beneficio para la inmovilización covalente de moléculas bioactivas (39).

Este tratamiento superficial da lugar a la formación de una matriz nanoestructurada en la superficie del material, proporcionando un aumento en la expresión de algunas proteínas, como la osteopontina y la sialoproteína ósea, en cultivo de células osteogénicas primarias (40). El tratamiento químico superficial del Ti con ácido clorhídrico (HCl) combinado con H_2O_2 también favorece la formación ósea, facilitando el depósito de apatita, mejorando la osteointegración, además de ser un método sencillo (41). La sustracción por grabado ácido es el método de texturizado más utilizado por la industria, y los ácidos más utilizados son: fluorhídrico (HF), nítrico (HNO_3), sulfúrico (H_2SO_4) o una combinación de ellos (42).

DESARROLLO

Más recientemente, el desarrollo de superficies nanoestructuradas ha demostrado que pueden aumen-

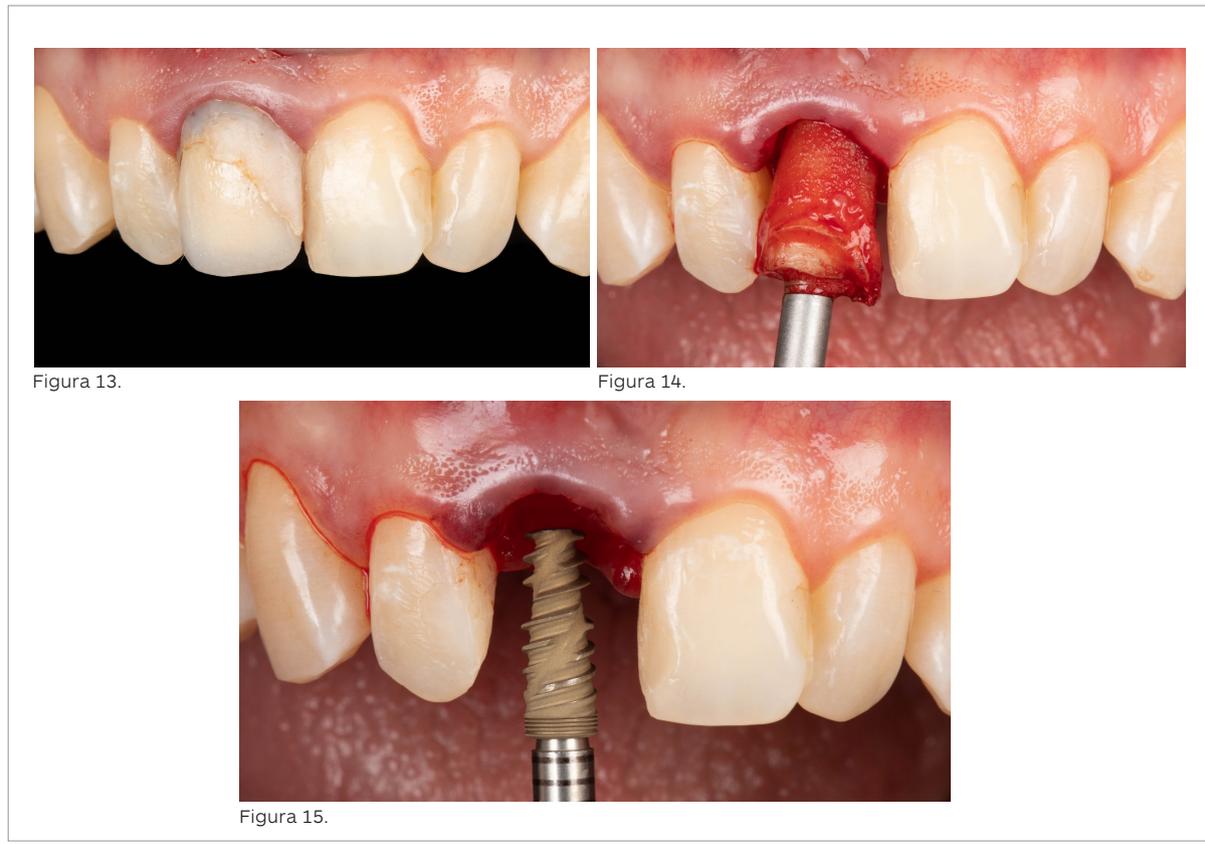
tar considerablemente la adhesión de las células óseas y, también, la producción de matriz ósea necesaria para el proceso de mineralización y mantenimiento del hueso que rodea al implante (43). Las modificaciones topográficas de los implantes pueden variar desde milímetros hasta nanómetros (44).

Los estudios buscan desarrollar nanoestructuras para implantes osteointegrados y se basan en la arquitectura presente en el hueso, resultando en una mejor organización nanotopográfica tridimensional (45). Además, las biomoléculas y las células involucradas en la cicatrización temprana interactuarán a nivel nanométrico (46).

Se han propuesto nanoestructuras aplicadas a biomateriales para proporcionar un grado superior de osteointegración (47). Los estudios han demostrado que la respuesta biológica es sensible a diferentes nanoestructuras (14, 48). En un estudio de 2007 (49), los autores concluyeron que las nanoestructuras de menos de 100 nanómetros son más eficaces en la integración celular. Un estudio en conejos (50) observó un aumento

temprano en la formación de hueso en implantes modificados con nano-hidroxiapatita (nanoHA), lo que según los autores puede haber sido resultado de la posible bioactividad química de la hidroxiapatita o de la topografía de las nanoestructuras implementadas. Otro estudio, que abordó la expresión génica alrededor de los implantes recubiertos con nanoHA, observó que hubo un aumento significativo en la expresión génica osteogénica, lo que sugiere que nanoHA participa activamente en la formación ósea (51).

Con base en los prometedores resultados de estudios clínicos y preclínicos (50, 52) de implantes recubiertos con nanoHA, una empresa brasileña lanzó al mercado implantes con una superficie nanométrica homogénea de hidroxiapatita de 20 NM de espesor (S.I.N. Implant System, São Paulo, Brasil). Los nanocristales de hidroxiapatita funcionan como un catalizador de cicatrización que, en contacto con el coágulo de sangre presente en las cámaras de cicatrización, aceleran el proceso de cicatrización y aumentan el área de contacto entre hueso e implante en un menor tiempo (**Figuras 13-19**).



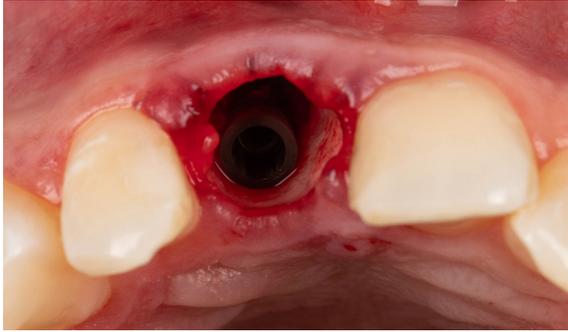


Figura 16.



Figura 17.



Figura 18.



Figura 19.

Figuras 13-19. Imágenes que muestran un caso clínico desafiante de extracción de un incisivo central superior, colocación inmediata de un implante con macrogeometría adecuada para carga inmediata y con una superficie biomimética (Epikut Plus, S.I.N. Implant System, São Paulo, Brasil), rehabilitación estética y radiografía de control con 16 meses de seguimiento.

DISCUSIÓN

Estudios en el área de la Biotecnología enfocados en el campo de los implantes dentales han apuntado estrategias que pueden reducir el tiempo de rehabilitación de pacientes que padecen edentulismo (1, 53). En este contexto, el desarrollo de nuevas superficies de titanio biofuncionales, o el desarrollo de nuevos materiales, ha demostrado ser fundamental para estimular el desempeño de las células osteoprogenitoras y así acelerar la neoformación ósea alrededor de los dispositivos implantables, impactando positivamente en el proceso de osteointegración (54, 55).

Por lo tanto, una serie de estudios previos investigaron los mecanismos de señalización celular involucrados en las respuestas a diferentes biomateriales (4, 10, 12, 16, 17) para identificar biomarcadores intracelulares relacionados con este escenario, pro-

poniendo la importancia de la participación de Src y FAK como proteínas señalizadoras que identifican la textura superficial de sustratos (19, 56).

El ataque celular es un evento biológico temprano responsable de la integración de dispositivos implantables en el tejido óseo. Además, el recubrimiento proteico de los implantes es un evento que ocurre antes de la llegada de las células. Las diferentes texturas de las superficies de titanio promueven diferentes respuestas en la adsorción de proteínas, principalmente relacionadas con la rugosidad de la superficie (10), y el titanio en los implantes dentales aumenta la adhesión preosteoblástica, a través de la modulación de ROS (4).

Las propiedades fisicoquímicas de la superficie, como la humectabilidad (evaluada a través del ángulo de contacto con el agua) y la topografía de la su-

perficie (evaluada mediante microscopía de fuerza atómica) interfieren profundamente con la adhesión celular, la propagación, la proliferación y la diferenciación tardía. Siguiendo una secuencia jerárquica de eventos biológicos alrededor de los dispositivos implantables, la humectabilidad inicia una línea de tiempo compleja que favorecerá o no la reparación del tejido. La humectabilidad de la superficie dirige la adsorción de proteínas, estableciendo un recubrimiento biológico e impactando en la interacción celular tardía. Por lo general, se informa que la adhesión celular requiere una hidrofiliidad moderada, pero el rendimiento celular se modula negativamente cuando el material se vuelve demasiado hidrofílico.

Cabe señalar que durante la adhesión de células eucariotas, tanto FAK como Src son proteínas responsables de modular los mecanismos intracelulares para controlar la interacción celular a través de la activación de integrinas (10, 13). Los mecanismos intracelulares a través de las vías de las integrinas/

FAK/Src promueven un reordenamiento del citoesqueleto, y éste parece ser decisivo para la adaptación celular en superficies con diferente rugosidad, determinando la morfología celular. Los cambios morfológicos durante la adaptación celular dependen de la activación de FAK y Src, como se demostró previamente en la adhesión de osteoblastos a superficies de poliestireno(57). FAK y Src reconocen las propiedades fisicoquímicas de las superficies y se consideran biomarcadores importantes de la interacción célula-superficie.

Otro punto importante a discutir es la influencia de nanoHA en la promoción de la diferenciación osteoblástica al aumentar significativamente la actividad de biomarcadores clásicos como RUNX2 y la fosfatasa alcalina. Estas características influyen en la respuesta biológica a los aparatos implantables al acelerar la reparación del tejido y la posterior osteointegración (53, 55). En cuanto a la biofuncionalidad de la superficie nanoHA, la mezcla íntima de



los componentes del recubrimiento permite el procesamiento a temperaturas más bajas evitando transiciones de fase indeseables debido a una alta homogeneidad del recubrimiento (50, 58).

Estos hallazgos celulares apoyaron los resultados obtenidos en varios estudios con animales. Un estudio evaluó en tibia de conejo, la expresión génica, así como los valores del torque de extracción del implante (TRI) alrededor de los implantes recubiertos con nanoHA, en comparación con los implantes de titanio sin recubrimiento. Después de 2 semanas, los valores de expresión de los genes TRI y fosfatasa alcalina fueron significativamente más altos en el grupo nanoHA, y la expresión de los genes RUNX-2 y TNF- α fue menor (51).

Un resultado similar también se observó en otro estudio del mismo grupo (59), en el que se demostró que la superficie nanoHA aumenta las propiedades mecánicas del hueso en la interfaz con el implante, en las cámaras de cicatrización, en comparación con una superficie sin la adición de nanoHA. Las evaluaciones realizadas por nanoindentación muestran, en un período de seguimiento de 3 semanas, un

aumento significativo en el módulo de elasticidad y dureza del hueso ubicado inmediatamente en la interfaz a regiones relativamente distantes.

Estudios recientes han demostrado que esta superficie de implantes con nanoHA mostró una mayor osteointegración en estudios *in vivo* en animales con mala reparación ósea (60, 61), y con hueso de baja densidad (25), incluyendo implantes con la misma macroestructura (Epikut Plus) presentados en el caso clínico ilustrado aquí (Figura 20).

CONCLUSIÓN

Los mecanismos de señalización intracelular implicados en la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos han demostrado en varios estudios *in vitro* la superioridad de HAnano Surface, (Promimic, Gotemburgo, Suecia), presente en S.I.N. Implant System (São Paulo, Brasil), en eventos que rigen la biocompatibilidad y la osteointegración.

Además, los estudios en animales corroboran los hallazgos *in vitro*, proporcionando una base científica sólida para el uso de estos implantes en humanos, especialmente en situaciones clínicas desafiantes.

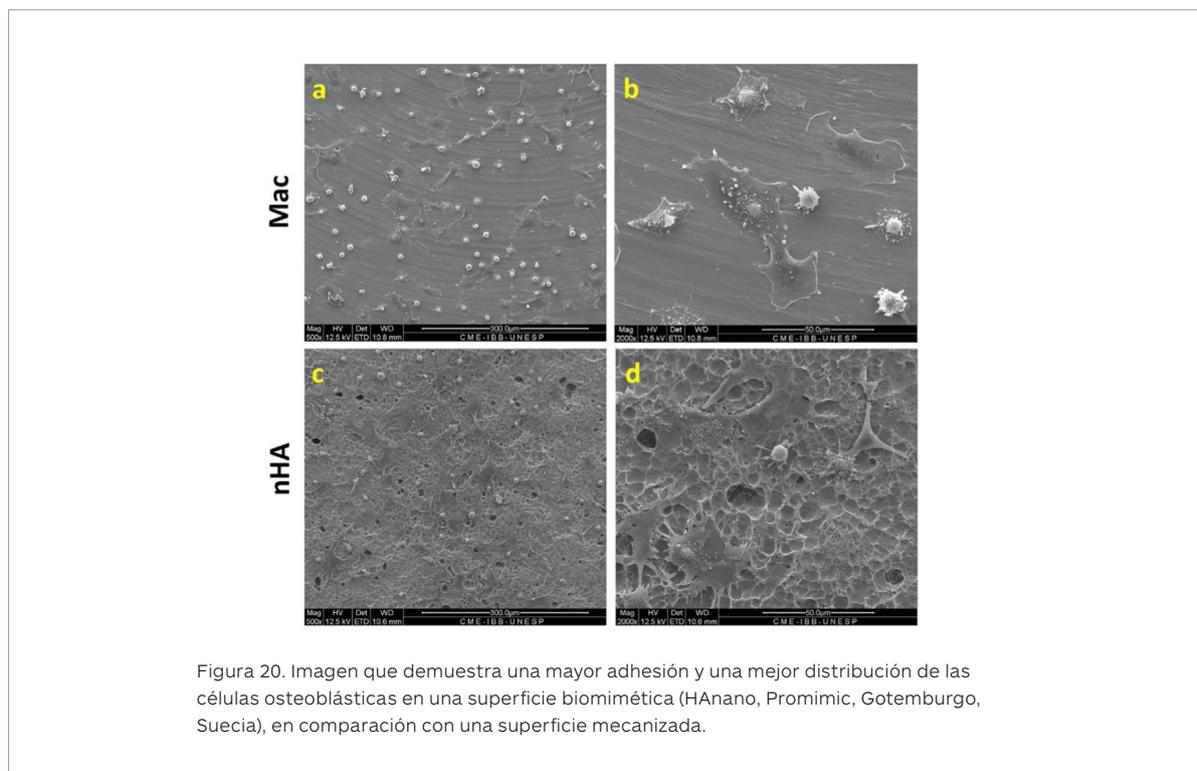


Figura 20. Imagen que demuestra una mayor adhesión y una mejor distribución de las células osteoblásticas en una superficie biomimética (HAnano, Promimic, Gotemburgo, Suecia), en comparación con una superficie mecanizada.

BIBLIOGRAFÍA

- Sohrabi K, Mushantat A, Esfandiari S, Feine J. How successful are small-diameter implants? A literature review. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23 (5): 515-25.
- Gaviria L, Salcido JP, Guda T, Ong JL. Current trends in dental implants. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2014; 40 (2): 50-60.
- Martinez EF, Ishikawa GJ, de Lemos AB, Barbosa Bezerra FJ, Speardio M, Napimoga MH. Evaluation of a Titanium Surface Treated with Hydroxyapatite Nanocrystals on Osteoblastic Cell Behavior: An In Vitro Study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2018; 33 (3): 597-602.
- Rossi MC, Bezerra FJB, Silva RA, Crulhas BP, Fernandes CJC, Nascimento AS, et al. Titanium-released from dental implant enhances pre-osteoblast adhesion by ROS modulating crucial intracellular pathways. *J Biomed Mater Res A.* 2017; 105 (11): 2968-76.
- Fernandes CJC, Bezerra F, do Carmo MDD, Feltran GS, Rossi MC, da Silva RA, et al. CoCr-enriched medium modulates integrin-based downstream signaling and requires a set of inflammatory genes reprogramming in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2018; 106 (3): 839-49.
- Di Liddo R, Paganin P, Lora S, Dalzoppo D, Giraudo C, Miotto D, et al. Poly-epsilon-caprolactone composite scaffolds for bone repair. *Int J Mol Med.* 2014; 34 (6): 1537-46.
- Salou L, Hoornaert A, Stanovici J, Briand S, Louarn G, Layrolle P. Comparative bone tissue integration of nanostructured and microroughened dental implants. *Nanomedicine (Lond).* 2015; 10 (5): 741-51.
- Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20 Suppl 4: 172-84.
- Rosa MB, Albrektsson T, Francischone CE, Filho HO, Wennerberg A. Micrometric characterization of the implant surfaces from the five largest companies in Brazil, the second largest worldwide implant market. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013; 28 (2): 358-65.
- Zambuzzi WF, Bonfante EA, Jimbo R, Hayashi M, Andersson M, Alves G, et al. Nanometer scale titanium surface texturing are detected by signaling pathways involving transient FAK and Src activations. *PloS one.* 2014; 9 (7): e95662.
- Da Silva RA, da Silva Feltran G, Ferreira MR, Wood PF, Bezerra F, Zambuzzi WF. The Impact of Bioactive Surfaces in the Early Stages of Osseointegration: An In Vitro Comparative Study Evaluating the HAnano(R) and SLActive(R) Super Hydrophilic Surfaces. *Biomed Res Int.* 2020; 2020: 3026893.
- Bezerra F, Ferreira MR, Fontes GN, da Costa Fernandes CJ, Andia DC, Cruz NC, et al. Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface affects pre-osteoblast morphology by modulating critical intracellular pathways. *Biotechnol Bioeng.* 2017; 114 (8): 1888-98.
- Barkarmo S, Andersson M, Currie F, Kjellin P, Jimbo R, Johansson CB, et al. Enhanced bone healing around nanohydroxyapatite-coated polyetheretherketone implants: An experimental study in rabbit bone. *Journal of biomaterials applications.* 2014; 29 (5): 737-47.
- Jimbo R, Sotres J, Johansson C, Breiding K, Currie F, Wennerberg A. The biological response to three different nanostructures applied on smooth implant surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23 (6): 706-12.
- Agarwal R, Garcia AJ. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015; 94: 53-62.
- Gemini-Piperni S, Milani R, Bertazzo S, Peppelenbosch M, Takamori ER, Granjeiro JM, et al. Kinome profiling of osteoblasts on hydroxyapatite opens new avenues on biomaterial cell signaling. *Biotechnol Bioeng.* 2014; 111 (9): 1900-5.
- Gemini-Piperni S, Takamori ER, Sartoretto SC, Paiva KB, Granjeiro JM, de Oliveira RC, et al. Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: a closer look at cell-biomaterial interface. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 561: 88-98.
- Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective. *Bone Res.* 2013; 1 (3): 216-48.
- Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DD, Ferreira CV, Bertran CA. A simple method for enhancing cell adhesion to hydroxyapatite surface. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21 (12): 1411-3.
- Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DD, Ogeda TL, Ferreira CV, Bertran CA. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010; 78 (2): 177-84.
- Zambuzzi WF, Fernandes GV, Iano FG, Fernandes Mda S, Granjeiro JM, Oliveira RC. Exploring anorganic bovine bone granules as osteoblast carriers for bone bioengineering: a study in rat critical-size calvarial defects. *Brazilian dental journal.* 2012; 23 (4): 315-21.
- Zambuzzi WF, Ferreira CV, Granjeiro JM, Aoyama H. Biological behavior of pre-osteoblasts on natural hydroxyapatite: a study of signaling molecules from attachment to differentiation. *J Biomed Mater Res A.* 2011; 97 (2): 193-200.
- Zambuzzi WF, Coelho PG, Alves GG, Granjeiro JM. Intracellular signal transduction as a factor in the development of "smart" biomaterials for bone tissue engineering. *Biotechnol Bioeng.* 2011; 108 (6): 1246-50.
- Mello-Machado RC, Sartoretto SC, Granjeiro JM, Calasans-Maia JA, de Uzeda M, Mourao C, et al. Osseodensification enables bone healing chambers with improved low-density bone site primary stability: an in vivo study. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 15436.
- Sartoretto SC, Calasans-Maia J, Resende R, Camara E, Ghiraldini B, Barbosa Bezerra FJ, et al. The Influence of Nanostructured Hydroxyapatite Surface in the Early Stages of Osseointegration: A Multiparameter Animal Study in Low-Density Bone. *Int J Nanomedicine.* 2020; 15: 8803-17.
- Hu N, Feng C, Jiang Y, Miao Q, Liu H. Regulative Effect of Mir-205 on Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells (BMSCs): Possible Role of SATB2/Runx2 and ERK/MAPK Pathway. *Int J Mol Sci.* 2015; 16 (5): 10491-506.
- Jiang T, Guo L, Ni S, Zhao Y. Upregulation of cell proliferation via Shc and ERK1/2 MAPK signaling in SaOS-2 osteoblasts grown on magnesium alloy surface coating with tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26 (4): 158.
- Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem.* 2016; 109: 314-41.
- Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1969; 3 (2): 81-100.
- 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.
- Wennerberg A, Albrektsson T, Johansson C, Andersson B. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials.* 1996; 17 (1): 15-22.
- Coelho PG, Lemons JE. Physico/chemical characterization and in vivo evaluation of nanothickness bioceramic depositions on alumina-blasted/acid-etched Ti-6Al-4V implant surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 90 (2): 351-61.
- Coelho PG, Jimbo R, Tovar N, Bonfante EA. Osseointegration: hierarchical designing encompassing the micrometer, micrometer, and nanometer length scales. *Dent Mater.* 2015; 31 (1): 37-52.
- 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.
- Yoon SR, Cha JK, Lim HC, Lee JS, Choi SH, Jung UW. De novo bone formation underneath the sinus membrane supported by a bo-

- ne patch: a pilot experiment in rabbit sinus model. *Clin Oral Implants Res.* 2016.
36. **Buser D, Brogini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al.** Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res.* 2004; 83 (7): 529-33.
 37. **Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D.** Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res.* 1998; 40 (1): 1-11.
 38. **Pan J, Liao H, Leygraf C, Thierry D, Li J.** Variation of oxide films on titanium induced by osteoblast-like cell culture and the influence of an H₂O₂ pretreatment. *J Biomed Mater Res.* 1998; 40 (2): 244-56.
 39. **Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, et al.** Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res.* 1998; 40 (2): 324-35.
 40. **De Oliveira PT, Nanci A.** Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials.* 2004; 25 (3): 403-13.
 41. **Shi GS, Ren LF, Wang LZ, Lin HS, Wang SB, Tong YQ.** H₂O₂/HCl and heat-treated Ti-6Al-4V stimulates pre-osteoblast proliferation and differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108 (3): 368-75.
 42. **Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T.** Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol.* 2010; 28 (4): 198-206.
 43. **Oh SH, Finones RR, Daraio C, Chen LH, Jin S.** Growth of nanoscale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials.* 2005; 26 (24): 4938-43.
 44. **Hall J, Miranda-Burgos P, Sennerby L.** Stimulation of directed bone growth at oxidized titanium implants by macroscopic grooves: an in vivo study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2005; 7 Suppl 1: S76-82.
 45. **Weiner S, Traub W.** Bone structure: from angstroms to microns. *FASEB J.* 1992; 6 (3): 879-85.
 46. **Aumailley M, Gayraud B.** Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med (Berl).* 1998; 76 (3-4): 253-65.
 47. **Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A.** Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004; 19 (5): 659-66.
 48. **Coelho PG, Freire JN, Granato R, Marin C, Bonfante EA, Gil JN, et al.** Bone mineral apposition rates at early implantation times around differently prepared titanium surfaces: a study in beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011; 26 (1): 63-9.
 49. **Webster TJ, Ahn ES.** Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007; 103: 275-308.
 50. **Meirelles L, Arvidsson A, Andersson M, Kjellin P, Albrektsson T, Wennerberg A.** Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 87 (2): 299-307.
 51. **Jimbo R, Xue Y, Hayashi M, Schwartz-Filho HO, Andersson M, Mustafa K, et al.** Genetic responses to nanostructured calcium-phosphate-coated implants. *J Dent Res.* 2011; 90 (12): 1422-7.
 52. **Shunmugasamy VC, Gupta N, Pessoa RS, Janal MN, Coelho PG.** Influence of clinically relevant factors on the immediate biomechanical surrounding for a series of dental implant designs. *J Biomech Eng.* 2011; 133 (3): 031005.
 53. **Dang Y, Zhang L, Song W, Chang B, Han T, Zhang Y, et al.** In vivo osseointegration of Ti implants with a strontium-containing nanotubular coating. *Int J Nanomedicine.* 2016; 11: 1003-11.
 54. **Kulkarni M, Mazare A, Gongadze E, Perutkova S, Kralj-Iglic V, Milosev I, et al.** Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology.* 2015; 26 (6): 062002.
 55. **Longo G, Ioannidu CA, Scotto d'Abusco A, Superti F, Misiano C, Zanoni R, et al.** Improving Osteoblast Response In Vitro by a Nanostructured Thin Film with Titanium Carbide and Titanium Oxides Clustered around Graphitic Carbon. *PloS one.* 2016; 11 (3): e0152566.
 56. **Zambuzzi WF, Milani R, Teti A.** Expanding the role of Src and protein-tyrosine phosphatases balance in modulating osteoblast metabolism: lessons from mice. *Biochimie.* 2010; 92 (4): 327-32.
 57. **Zambuzzi WF, Bruni-Cardoso A, Granjeiro JM, Peppelenbosch MP, de Carvalho HF, Aoyama H, et al.** On the road to understanding of the osteoblast adhesion: cytoskeleton organization is rearranged by distinct signaling pathways. *J Cell Biochem.* 2009; 108 (1): 134-44.
 58. **Gottlander M, Johansson CB, Wennerberg A, Albrektsson T, Radin S, Ducheyne P.** Bone tissue reactions to an electrophoretically applied calcium phosphate coating. *Biomaterials.* 1997; 18 (7): 551-7.
 59. **Jimbo R, Coelho PG, Bryington M, Baldassarri M, Tovar N, Currie F, et al.** Nano hydroxyapatite-coated implants improve bone nanomechanical properties. *J Dent Res.* 2012; 91 (12): 1172-7.
 60. **Oliveira P, Coelho PG, Bergamo ETP, Witek L, Borges CA, Bezerra FB, et al.** Histological and Nanomechanical Properties of a New Nanometric Hydroxyapatite Implant Surface. An In Vivo Study in Diabetic Rats. *Materials (Basel).* 2020;13(24).
 61. **Oliveira P, de Melo Soares MS, Silveira ESAMM, Taba M, Jr., Pallioto DB, Messori MR, et al.** Influence of nano-hydroxyapatite coating implants on gene expression of osteogenic markers and micro-CT parameters. An in vivo study in diabetic rats. *J Biomed Mater Res A.* 2021; 109 (5): 682-94.