

EXAMINATION OF EXPLANTS BY ELECTRON MICROSCOPY AND CORRELATIONS WITH THE BIOMECHANICAL SCORE OF PROSTHETIC RESTORATIONS WITH IMPLANT SUPPORT

Examinarea unor explanturi prin microscopie electronică și corelații cu scorul biomecanic al restaurărilor protetice cu sprijin implantar

Drd. Dr. Michael Vitzu¹, Drd. Dr. Alexandru Daniel Referendaru¹, Prof. Dr. Emilian Hutu¹,
Conf. Dr. Oana Botoacă², Conf. Dr. Raluca Monica Comăneanu², Conf. Dr. Violeta Hancu²,
Prof. Dr. Ing. Mihail Târcolea³

¹ Școala Doctorală Medicină Dentară, București, România

² Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea „Titu Maiorescu“, București, România

³ Școala Doctorală Știința și Ingineria Materialelor, Universitatea Politehnica, București, România

ABSTRACT

Objectives. The objective of our study was to evaluate the bone-implant interface in 10 cases of failure of fixed implant-prosthetic treatment by electron microscopy and spectrophotometry, in correlation with the evolution of Renouard-Rangert biomechanical scoring.

Material and method. The study material was represented by 10 dental implants of 3 different morphological types (A, B, C), from the Biomat © collection, Polytechnic University of Bucharest, which were examined under the Phenom ProX electron microscope. The studied samples had a file in which there was noted the biomechanical score Renouard-Rangert from the treatment planning phase, but also from the patient dispensary phase. The survival time of the analyzed samples at the level of the maxillary bones was 7-24 months.

Results. Following the examination at the electron microscope, the presence of an adherent neof ormation bone tissue was detected on every implant, which covered each implant relatively uniform, with different degrees of mineralization depending on the type of implant, the duration of bone implantation and evolution of biomechanical scoring in red or yellow.

Discussions. The use in our study only of standard size implants is an important advantage over other studies using mini-implants or temporary implants. The cases in which the biomechanical scoring reached "red" showed a lower degree of mineralization, and those that reached "yellow" had a higher degree of mineralization. Among the cases with biomechanical scoring "in yellow" were samples collected from the posterior maxillary region, generally considered a risk area in implantology.

Conclusions. In our study we found a correspondence between the modification of the Renouard-Rangert biomechanical scoring and the degree of mineralization of the bone deposited on the surface of the explants. Regardless of the evolution of biomechanical scoring, on all 10 analyzed samples we found a close contact between the neof ormation tissue and the implanted devices, which indicates the high biocompatibility of the three types of implants. The relatively small number of samples analyzed is a limitation of our study. In the future, we recommend, in order to validate the results, to extend the study to a greater number of cases.

Keywords: dental implant, electron microscopy, spectrophotometry, biomechanical score

REZUMAT

Obiective. Obiectivul studiului nostru a fost evaluarea interfeței os-implant în 10 cazuri de eșec al tratamentului implanto-protetic fix prin microscopie electronică și spectrofotometrie, în corelație cu evoluția scorului biomecanic Renouard-Rangert.

Material și metodă. Materialul de studiu a fost reprezentat de 10 implanturi dentare de 3 tipuri morfologice diferite (A, B, C), provenite din colecția Biomat©, Universitatea Politehnica din București, care au fost examinate la microscopul electronic Phenom ProX. Probele studiate au avut o fișă în care era notat scorul biomecanic Renouard-Rangert din faza de planificare a tratamentului, dar și din faza de dispensarizare a pacientului. Durata de supraviețuire a eșantioanelor analizate la nivelul oaselor maxilare a fost de 7-24 luni.

Autor de corespondență:
Conf. Dr. Raluca Monica Comăneanu
E-mail: monica_tarcolea@yahoo.co.uk

Rezultate. În urma examinării la microscopul electronic, pe fiecare implant a fost detectată prezența unui țesut osos de neoformație aderent, care acoperea relativ uniform fiecare implant, cu grade de mineralizare diferite în funcție de tipul de implant, de durata menținerii implantului în os și de virarea scorului biomecanic „în roșu” sau „în galben”.
Discuții. Utilizarea în studiul nostru doar a implanturilor de dimensiuni standard constituie un avantaj important, față de alte studii ce folosesc miniimplanturi sau implanturi cu caracter provizoriu. Cazurile în care scorul biomecanic a ajuns „în roșu” au prezentat un grad mai redus de mineralizare, iar cele care au ajuns „în galben” au avut un grad mai ridicat de mineralizare. Printre cazurile cu scor biomecanic „în galben” au fost și probe recoltate din regiunea posterioară maxilară, considerată în general o zonă de risc în implantologie.
Concluzii. În studiul nostru, am depistat o corespondență între modificarea scorului biomecanic Renouard-Rangert și gradul de mineralizare a osului de pe suprafața explantelor. Indiferent de evoluția scorului biomecanic, pe toate cele 10 probe analizate am depistat un contact strâns între țesutul de neoformație și dispozitivele implantate, ceea ce indică biocompatibilitatea înaltă a celor 3 tipuri de implanturi. Numărul relativ redus de probe analizate constituie o limitare a studiului nostru. Recomandăm pe viitor, pentru validarea rezultatelor, extinderea studiului la un număr mai mare de cazuri.

Cuvinte cheie: implant dentar, microscopie electronică, spectrofotometrie, scor biomecanic

INTRODUCERE

Rata de eșec a terapiei implanto-protetice se situează, conform studiilor, între 3 și 8%, în corelație cu starea generală de sănătate a pacienților și în funcție de designul implantului [1-4].

Datorită proprietăților mecanice și chimice, dar și capacității de osteointegrare și biocompatibilității generale, aliajele de titan reprezintă în prezent materialele de elecție utilizate pentru confecționarea implanturilor dentare [5-7]. În ultimii ani, s-a pus accent pe tratamentul suprafeței implanturilor, dovedindu-se științific că rugozitatea suprafeței implantului accelerează integrarea osoasă [8-11]. În plus, au fost studiate depunerile pe suprafața implanturilor din aliaj de titan, cu intenția de a stimula osteointegrarea [12-14].

Renouard și Rangert [15] au propus, pentru evaluarea prognosticului pe termen lung al restaurărilor implantoportate fixe, un scor biomecanic ce reprezintă însumarea unor note acordate pentru fiecare posibil factor de risc al unei proteze fixe cu sprijin implantar. Pentru fiecare restaurare implanto-protetică se poate stabili un scor inițial, în faza de planificare a tratamentului, dar și un scor final, pe baza analizei rezultatelor obținute.

În prezentul studiu, am examinat prin microscopie electronică și prin spectrofotometrie 10 cazuri de eșec al tratamentului implanto-protetic. Rezultatele obținute au fost raportate la modificările de scor biomecanic [15] pentru fiecare caz. Un scor mai mic de 2 („în verde”) nu relevă un factor de risc terapeutic, scorul între 2 și 3 („în galben”) presupune un risc mediu, iar un scor peste 3 („în roșu”) indică un risc crescut de eșec.

MATERIAL ȘI METODĂ

Am inclus în studiu 10 implanturi de 3 tipuri, cu diferite morfologii ale suprafețelor, din colecția

Biomat[®] – structură de cercetare din Universitatea Politehnica din București.

Probele au fost investigate din punctul de vedere al compoziției și al morfologiei suprafeței cu ajutorul microscopului electronic Phenom ProX (PhenomWorld, Olanda).

Probele studiate au avut o fișă în care exista notat scorul biomecanic Renouard-Rangert din faza de planificare a tratamentului, dar și din faza de dispensarizare a pacientului. Durata de supraviețuire a eșantionelor analizate la nivelul oaselor maxilare a fost de 7-24 luni.

Pe fiecare eșantion au fost selectate mai multe puncte în care s-a analizat prin spectrofotometrie compoziția elementală, iar imaginile au fost achiziționate la o mărire la 500x.

Acest studiu, fiind unul retrospectiv, nu a necesitat consimțământul scris al pacienților implicați.

REZULTATE

Probele 1-2-3 au conținut implanturi de tip A, conic, cu suprafața prelucrată chimic (îmbogățită cu fosfor, calciu și oxigen) și fizic (sablare cu particule de Al_2O_3 și decapare acidă).

Prima probă a fost explantată din zona laterală maxilară a unei paciente de 69 ani. Pe respectivul implant era confecționată o coroană amovibilă la care s-a produs fractura repetată a materialului fizionomic, ceea ce a impus îndepărtarea coroanei și refacerea acesteia.

După fractura materialului ceramic a treia oară, la îndepărtarea coroanei s-a constatat apariția mobilității implantului dentar. Fractura repetată a materialului fizionomic a dus la virarea „în roșu” a scorului biomecanic Renouard-Rangert.

Explantarea piesei s-a produs la 18 luni de la inserare și după un an de la protezare, iar eșantionul

prelevat a fost trimis la microscopul electronic pentru examinare.

Proba 2 a fost explantată, de asemenea, din zona laterală maxilară, dar de la o pacientă de 52 ani. Respectivul implant nu a fost protezat, pentru că a prezentat de la început stabilitate primară redusă, cu scor biomecanic „în galben“, care a virat ulterior „în roșu“.

La descoperirea implantului la 7 luni de la inserare, s-a constatat că stabilitatea nu se îmbunătățise, astfel încât s-a recomandat îndepărtarea implantului.

În urma examinării probelor 1 și 2, am constatat că pe suprafața implantului era depus un strat relativ uniform de țesut de neoformație, care avea un grad redus de mineralizare.

Proba 3 a fost explantată din zona laterală maxilară a unui pacient de 63 ani. La controlul efectuat la 12 luni de la protezarea cu o coroană cimentată, respectiv 18 luni de la inserarea implantului, s-a constatat radiologic apariția unei resorbții oasoase periimplantare în pânlie, ceea ce a schimbat „în roșu“ scorul biomecanic și a indicat ablația coroanei și a implantului.

Element Number	Element Symbol	Element Name	Atomic Conc.	Weight Conc.
8	O	Oxygen	45.31	42.07
6	C	Carbon	43.56	30.36
22	Ti	Titanium	7.47	20.76
13	Al	Aluminium	1.24	1.94
20	Ca	Calcium	0.81	1.88
23	V	Vanadium	0.32	0.96
15	P	Phosphorus	0.51	0.91
11	Na	Sodium	0.51	0.68
14	Si	Silicon	0.22	0.36
16	S	Sulfur	0.05	0.09

A

Element Number	Element Symbol	Element Name	Atomic Conc.	Weight Conc.
8	O	Oxygen	44.48	48.94
6	C	Carbon	39.49	32.62
7	N	Nitrogen	14.54	14.00
22	Ti	Titanium	0.81	2.66
20	Ca	Calcium	0.54	1.50
15	P	Phosphorus	0.10	0.22
11	Na	Sodium	0.04	0.06
13	Al	Aluminium	0.00	0.00
14	Si	Silicon	0.00	0.00
16	S	Sulfur	0.00	0.00

B

Element Number	Element Symbol	Element Name	Atomic Conc.	Weight Conc.
6	C	Carbon	63.49	61.68
7	N	Nitrogen	17.80	20.17
5	B	Boron	14.64	12.80
8	O	Oxygen	4.03	5.21
16	S	Sulfur	0.03	0.09
15	P	Phosphorus	0.02	0.05
11	Na	Sodium	0.00	0.00
13	Al	Aluminium	0.00	0.00
14	Si	Silicon	0.00	0.00
20	Ca	Calcium	0.00	0.00
22	Ti	Titanium	0.00	0.00
23	V	Vanadium	0.00	0.00

C

FIGURA 1. Aspectul probelor 1-3 (implanturi de tip A) la microscopul electronic și analiza elementală prin spectrofotometrie

Implantul a prezentat la examinarea prin microscopie electronică un strat neuniform de țesut de neoformație, cu grad redus de mineralizare.

Probele 4-6 au conținut implanturi de tip B, care au suprafața sablată și ulterior gravată cu acizi carboxilici.

Proba 4 a fost explantată din zona laterală maxilară a unei paciente de 47 ani. La 18 luni de la încărcarea mecanică a implantului, pacienta a acuzat sensibilitate dureroasă în zonă și sângerare la

periaj, iar radiologic s-a depistat o resorbție osoasă în pânlie ce depășea prima spiră a implantului. Producerea resorbției osoase a dus la virarea scorului biomecanic final „în galben“. S-a recomandat ablația implantului și proba prelevată a fost trimisă spre examinare la microscopul electronic.

Implantul a fost acoperit cu țesut de neoformație bogat reprezentat, cu grad de mineralizare crescut.

Proba 5 a provenit de la o pacientă de 61 ani cu edentație laterală maxilară. La 2 ani după încărcarea

Element Number	Element Symbol	Element Name	Atomic Conc.		Weight Conc.	
			Atomic Conc.	Weight Conc.		
8	O	Oxygen	43.65	35.33		
20	Ca	Calcium	15.31	31.04		
6	C	Carbon	23.80	14.46		
15	P	Phosphorus	5.60	8.77		
7	N	Nitrogen	10.13	7.18		
22	Ti	Titanium	1.09	2.63		
11	Na	Sodium	0.24	0.28		
14	Si	Silicon	0.06	0.09		
23	V	Vanadium	0.03	0.09		
16	S	Sulfur	0.06	0.09		
13	Al	Aluminium	0.04	0.05		

A

Element Number	Element Symbol	Element Name	Atomic Conc.		Weight Conc.	
			Atomic Conc.	Weight Conc.		
20	Ca	Calcium	14.39	29.76		
8	O	Oxygen	34.21	28.25		
7	N	Nitrogen	37.60	27.18		
22	Ti	Titanium	2.37	5.85		
6	C	Carbon	9.34	5.79		
15	P	Phosphorus	1.58	2.53		
13	Al	Aluminium	0.27	0.37		
11	Na	Sodium	0.25	0.29		
23	V	Vanadium	0.00	0.00		
14	Si	Silicon	0.00	0.00		
16	S	Sulfur	0.00	0.00		

B

Element Number	Element Symbol	Element Name	Atomic Conc.		Weight Conc.	
			Atomic Conc.	Weight Conc.		
8	O	Oxygen	43.57	35.31		
20	Ca	Calcium	14.98	30.42		
6	C	Carbon	20.20	12.29		
15	P	Phosphorus	6.98	10.96		
7	N	Nitrogen	13.11	9.30		
12	Mg	Magnesium	0.49	0.60		
22	Ti	Titanium	0.25	0.60		
11	Na	Sodium	0.31	0.36		
14	Si	Silicon	0.08	0.11		
13	Al	Aluminium	0.03	0.05		
23	V	Vanadium	0.00	0.00		
16	S	Sulfur	0.00	0.00		

C

FIGURA 2. Aspectul probelor 4-6 (implanturi de tip B) la microscopul electronic și analiza elementală prin spectrofotometrie

protetică, clinic s-a constatat mobilitatea coroanei amovibile cu agregare implantară. La examenul radiologic recomandat pacientei am depistat o resorbție osoasă în pânlie ce depășea prima spiră a implantului. Complicația terapeutică produsă a modificat scorul biomecanic „în galben“ și a dus la recomandarea de ablație a restaurării și a implantului.

La microscop, s-a evidențiat acoperirea implantului cu țesut de neoformație abundent, cu mineralizare crescută.

Proba 6 a provenit de la o pacientă în vârstă de 63 ani, ce prezenta în regiunea laterală maxilară o breșă edentată.

La acel nivel a fost inserat un implant pe care s-a confecționat o coroană amovibilă, la care s-a slăbit în mod repetat șurubul de fixare. La aproximativ 1 an și jumătate de la încărcarea ocluzală, pacienta a reclamat sângerare la periaj și sensibilitate dureroasă în zonă. În urma examinării clinice, s-a evidențiat mobilitatea crescută a ansamblului implant dentar-coroană, cu modificarea „în galben“ a scorului biomecanic, ceea ce a indicat ablația coroanei și a implantului.

La examinarea prin microscopie electronică și spectrofotometrie, am depistat acoperirea uniformă a implantului cu țesut osos de neoformație, bogat mineralizat.

Probele 7-10 aparțin unor implanturi de tip C, care au suprafața inițial sablată cu particule de mari dimensiuni, ce produc macrorugozități, acestea fiind apoi transformate în microrugozități, prin tratare acidă.

Proba 7 a fost recoltată din zona laterală maxilară a unui pacient de 58 ani. La 12 luni de la încărcarea ocluzală a implantului cu o restaurare protetică fixă cimentată, s-a constatat radiologic apariția resorbției osoase în pânlie, periimplantar. Complicația produsă a modificat scorul biomecanic „în roșu“ și a indicat ablația restaurării și a implantului. La examinarea efectuată în cadrul centrului Biomat©, am decelat acoperirea implantului cu țesut de neoformație, având o mineralizare foarte redusă.

Probele 8 și 9 provin de la o pacientă de 53 ani, cu breșe edentate mandibulare, la nivelul cărora s-au inserat implanturi dentare pe care s-au confecționat restaurări protetice fixe agregate prin înșurubare.

La 12 luni de la încărcarea ocluzală, s-a constatat că două dintre coroanele aplicate prezentau

slăbirea repetată a șuruburilor de fixare, cu schimbarea „în galben“ a scorului biomecanic.

S-a recomandat examinarea clinică a celor două implanturi după îndepărtarea lucrării protetice. S-a constatat mobilitatea implanturilor, ceea ce a impus ablația acestora. La microscopul electronic, s-a constatat acoperirea implanturilor cu țesut osos de neoformație, având un grad de mineralizare crescut.

Proba 10 a fost recoltată din zona mandibulară laterală a unei paciente de 59 ani. La aproximativ 1 an după protezarea unuia dintre implanturile inserate la acest nivel, s-a produs decimentarea repetată a uneia dintre coroanele cu agregare pe implant, în asociere cu o mobilitate a implantului ce a evoluat în timp. Această complicație a schimbat scorul biomecanic „în roșu“ și a necesitat ablația coroanei și a implantului.

La examinarea probei recoltate la microscopul electronic, s-a decelat prezența unui țesut osos de neoformație bogat mineralizat, ce învelea relativ uniform implantul.

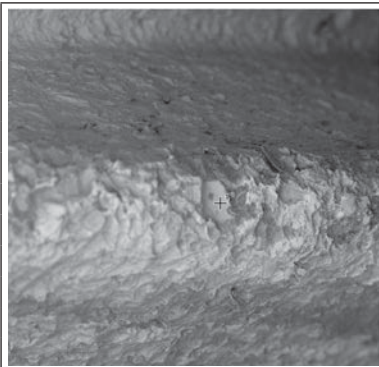
DISCUȚII

Din punct de vedere nanostructural, osul prezintă caracteristici constitutive mai reduse de 100 nm, alcătuit din compuși organici (preponderent colagen), întăriți de compuși anorganici (hidroxiapatită) [16].

Este cunoscut faptul că evaluarea *in vivo* a osteointegrării se realizează cel mai bine prin analiza histomorfometrică și histologică a țesutului periimplantar recuperat de pe suprafața unui implant ce a fost osteointegrat în osul nativ uman [17,18]. În practica curentă, se utilizează în acest scop cel mai frecvent miniimplanturile ortodontice sau implanturile temporare [17-20], dar în studiul nostru am utilizat implanturi pe care au funcționat diverse perioade de timp restaurări protetice finite, dar și-au pierdut stabilitatea.

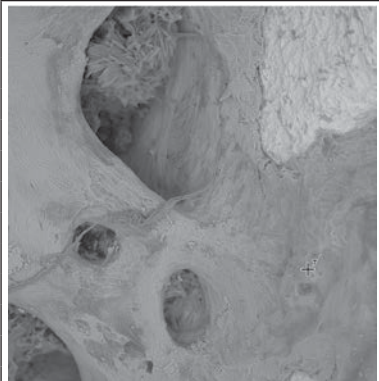
Utilizarea în studiul nostru doar a implanturilor de dimensiuni standard reprezintă un avantaj, ca și în alte studii [16,21], care au analizat vindecarea osoasă în situații clinice reale.

În funcție de textura suprafețelor lor, de scorul biomecanic și de durata de timp cât au fost inserate în os, implanturile erau acoperite cu țesut osos de diferite grosimi, aflat în diverse stadii de mineralizare.



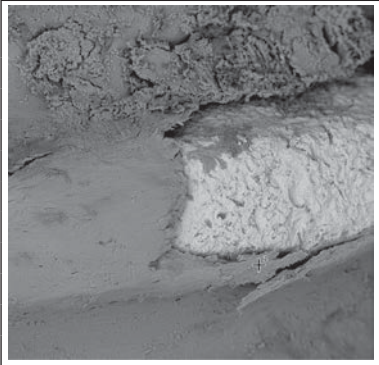
Element Number	Element Symbol	Element Name	Atomic Conc.	Weight Conc.
6	C	Carbon	39.01	28.06
22	Ti	Titanium	9.30	26.65
7	N	Nitrogen	23.06	19.34
8	O	Oxygen	15.46	14.81
5	B	Boron	11.06	7.16
13	Al	Aluminium	1.26	2.04
23	V	Vanadium	0.38	1.17
11	Na	Sodium	0.17	0.23
15	P	Phosphorus	0.08	0.15
14	Si	Silicon	0.07	0.11
16	S	Sulfur	0.05	0.10
20	Ca	Calcium	0.03	0.08
12	Mg	Magnesium	0.06	0.08

A



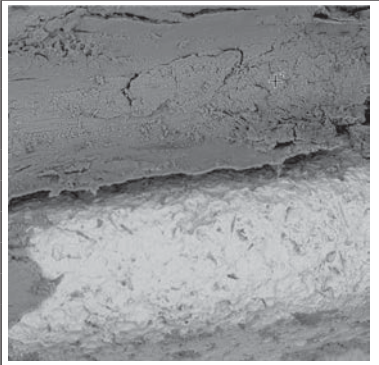
Element Number	Element Symbol	Element Name	Atomic Conc.	Weight Conc.
20	Ca	Calcium	13.52	27.95
8	O	Oxygen	30.25	24.96
6	C	Carbon	27.66	17.14
7	N	Nitrogen	18.73	13.53
15	P	Phosphorus	7.15	11.42
22	Ti	Titanium	1.26	3.10
11	Na	Sodium	0.66	0.78
13	Al	Aluminium	0.37	0.52
16	S	Sulfur	0.16	0.26
14	Si	Silicon	0.18	0.26
12	Mg	Magnesium	0.05	0.07

B



Element Number	Element Symbol	Element Name	Atomic Conc.	Weight Conc.
20	Ca	Calcium	19.39	28.99
8	O	Oxygen	30.80	18.38
75	Re	Rhenium	2.49	17.33
15	P	Phosphorus	11.85	13.69
7	N	Nitrogen	14.36	7.50
6	C	Carbon	16.26	7.29
22	Ti	Titanium	2.61	4.67
11	Na	Sodium	0.91	0.78
13	Al	Aluminium	0.54	0.54
14	Si	Silicon	0.31	0.33
16	S	Sulfur	0.24	0.29
12	Mg	Magnesium	0.23	0.21

C



Element Number	Element Symbol	Element Name	Atomic Conc.	Weight Conc.
8	O	Oxygen	39.23	40.67
6	C	Carbon	25.03	19.48
7	N	Nitrogen	19.23	17.45
22	Ti	Titanium	2.54	7.86
5	B	Boron	10.70	7.50
20	Ca	Calcium	1.38	3.58
15	P	Phosphorus	1.00	2.01
11	Na	Sodium	0.49	0.74
13	Al	Aluminium	0.37	0.64
14	Si	Silicon	0.02	0.04
16	S	Sulfur	0.01	0.02
12	Mg	Magnesium	0.00	0.00

D

FIGURA 3. Aspectul probelor 7-10 (implanturi de tip C) la microscopul electronic și analiza elementală prin spectrofotometrie

Cazurile în care scorul biomecanic a ajuns „în roșu“ au prezentat un grad mai redus de mineralizare, iar cele care au ajuns „în galben“ au avut un grad mai ridicat de mineralizare.

Printre cazurile cu scor biomecanic „în galben“, au fost și probe recoltate din regiunea posterioară maxilară, considerată în general o zonă de risc în implantologie, ca urmare a densității osoase reduse de la acest nivel [22-27].

În toate probele examinate în prezentul studiu, contactul os-implant a fost strâns. Absența metodelor standardizate [28-30] pentru aprecierea creșterii osoase și cuantificarea precisă a contactului os-implant fac necesară studiarea în continuare a fenomenului de osteointegrare la nivel nanometric.

CONCLUZII

În studiul nostru, am depistat o corespondență între modificarea scorului biomecanic Renouard-Rangert și gradul de mineralizare a osului de pe suprafața explantelor. Indiferent de evoluția scorului biomecanic, pe toate cele 10 probe analizate am depistat un contact strâns între țesutul de neoformație și dispozitivele implantate, ceea ce indică biocompatibilitatea înaltă a celor 3 tipuri de implanturi.

Numărul relativ redus de probe analizate constituie o limitare a studiului nostru. Recomandăm pe viitor, pentru validarea rezultatelor, extinderea studiului la un număr mai crescut de cazuri.

Notă

Toți autorii au avut contribuție egală la publicarea acestui material.

BIBLIOGRAFIE

- Tran D, Gay I, Diaz-Rodriguez J et al. Survival of dental implants placed in grafted and nongrafted bone: a retrospective study in a university setting. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2016;31(2):310-317.
- Lemos CAA, Alves MLF, Okamoto R et al. Short dental implants versus standard dental implants placed in the posterior jaws: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*. 2016;47:8-17.
- Han HJ, Kim S, Han DH. Multifactorial evaluation of implant failure: a 19-year retrospective study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2014;29(2):303-310.
- Sun HL, Huang C, Wu YR et al. Failure rates of short (≤ 10 mm) dental implants and factors influencing their failure: a systematic review. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2011;26(4):816-825.
- Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson T et al. Osseointegration of titanium implants. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1986; 57(4):285-289.
- Oldani C, Dominguez A. Titanium as a Biomaterial for Implants. In: Fokter S (ed.). *Recent Advances in Arthroplasty*. London: InTech Open, 2012.
- Geetha M, Singh AK, Asokamani R et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – a review. *Progress in Materials Science*. 2009;54(3):397-425.
- Lee BEJ, Ho S, Mestres G et al. Dual-topography electrical discharge machining of titanium to improve biocompatibility. *Surface and Coatings Technology*. 2016;296:149-156.
- Shah FA, Wang X, Thomsen P et al. High-resolution visualization of the osteocyte lacuno-canalicular network juxtaposed to the surface of nanotextured titanium implants in human. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2015;1(5):305-313.
- Palmquist A, Emanuelsson L, Brånemark R et al. Biomechanical, histological and ultrastructural analyses of laser micro- and nano-structured titanium implant after 6 months in rabbit. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2011;97B(2):289-298.
- Brånemark R, Emanuelsson L, Palmquist A et al. Bone response to laser-induced micro- and nano-size titanium surface features. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011;7(2):220-227.
- Grandfield K, Pujari S, Ott M et al. Effect of calcium and strontium on mesoporous titania coatings for implant applications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2013;4(2):107-113.
- Sul YT, Jönsson J, Yoon GS et al. Resonance frequency measurements in vivo and related surface properties of magnesium-incorporated, micropatterned and magnesium-incorporated TiUnite®, Osseotite®, SLA® and TiOblast® implants. *Clinical Oral Implants Research*. 2009;20(10):1146-1155.
- Poulos NM, Rodriguez NA, Lee J et al. Evaluation of a novel calcium phosphate-coated titanium porous oxide implant surface: a study in rabbits. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2011;26(4):731-738.
- Renouard F, Rangert B. *Risk Factors in Implant Dentistry - Quintessence Publishing* 1999;29-38,39-66.
- Mangano F, Raspanti M, Maghaireh H, Mangano C. Scanning Electron Microscope (SEM) Evaluation of the Interface between a Nanostructured Calcium-Incorporated Dental Implant Surface and the Human Bone. *Materials* (Basel). 2017 Dec 17;10(12):1438.
- Mangano FG, Pires, JT, Shibli JA et al. Early Bone Response to Dual Acid-Etched and Machined Dental Implants Placed in the Posterior Maxilla: A Histologic and Histomorphometric Human Study. *Implant Dent*. 2017;26:24-29.
- Kaluđerović MR, Schreckenbach JP, Graf HL. Titanium dental implant surfaces obtained by anodic spark deposition - From the past to the future. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Dec 1;69:1429-41.
- Mangano FG, Iezzi G, Shibli JA, Pires JT, Luongo G, Piattelli A, Mangano C. Early bone formation around immediately loaded implants with nanostructured calcium-incorporated and machined surface: a randomized, controlled histologic and histomorphometric study in the human posterior maxilla. *Clin Oral Invest*. 2017 Nov;21(8):2603-2611.
- Mangano C, Shibli JA, Pires JT, Luongo G, Piattelli A, Iezzi G. Early Bone Formation around Immediately Loaded Transitional Implants Inserted in the Human Posterior Maxilla: The Effects of Fixture Design and Surface. *Biomed Res Int*. 2017;2017:4152506.
- Comăneanu RM, Barbu HM, Coman C et al. Correlations between cyto-histopathological tissue changes at the dental implant interface and the degree of surface processing. *RJME*. 2014;55(2):335-341.

22. Ghoul WE, Chidiac JJ. Prosthetic requirements for immediate implant loading: a review. *J Prosthodont*. 2012 Feb;21(2):141-54.
23. De Bruyn H, Raes S, Ostman PO, Cosyn J. Immediate loading in partially and completely edentulous jaws: a review of the literature with clinical guidelines. *Periodontol* 2000. 2014 Oct;66(1):153-87.
24. Duyck J, Vandamme K. The effect of loading on peri-implant bone: a critical review of the literature. *J Oral Rehabil*. 2014 Oct; 41(10):783-94.
25. Akođlan M, Tatli U, Kurtođlu C, Salimov F, Kúrkcü M. Effects of different loading protocols on the secondary stability and peri-implant bone density of the single implants in the posterior maxilla. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2017 Aug;19(4):624-631.
26. Lioubavina-Hack N, Lang NP, Karring T. Significance of primary stability for osseointegration of dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Jun;17(3):244-50.
27. Bosshardt DD, Chappuis V, Buser D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontol* 2000. 2017 Feb;73(1):22-40.
28. Gehrke SA, Maté Sánchez de Val JE, Fernández Domínguez M, de Aza Moya PN, Gómez Moreno G, Calvo Guirado JL. Effects on the osseointegration of titanium implants incorporating calcium-magnesium: a resonance frequency and histomorphometric analysis in rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res*. 2018 Jul;29(7):785-791.
29. Park YS, Yi KY, Lee IS, Han CH, Jung YC. The effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the grit-blasted surface of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Jan-Feb;20(1):31-8.
30. Marin C, Granato R, Suzuki M, Gil JN, Piattelli A, Coelho PG. Removal torque and histomorphometric evaluation of bioceramic grit-blasted/acid-etched and dual acid-etched implant surfaces: an experimental study in dogs. *J Periodontol*. 2008 Oct;79(10):1942-9.