



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

GABRIELA ESTEVES DE CAMPOS

**ENSAIO DE CITOTOXICIDADE OSTEoblástica EM
AMOSTRAS POROSAS DAS LIGAS TI-6AL-4V,
TI-13NB-13ZR, TI-35NB, TI-35NB-7ZR-5TA E TICP**

2014

GABRIELA ESTEVES DE CAMPOS

**ENSAIO DE CITOTOXICIDADE OSTEoblástica EM
AMOSTRAS POROSAS DAS LIGAS TI-6AL-4V, TI-13NB-
13ZR, TI-35NB, TI-35NB-7ZR-5TA E TICP**

Dissertação 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 MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Prof^a Titular Yasmin Rodarte Carvalho

São José dos Campos
2014

Apresentação gráfica e normalização 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; 2013.

C157e Campos, Gabriela Esteves de
Ensaio de citotoxicidade osteoblástica em amostras porosas das ligas Ti-6Al-4V,
Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta e TiCP / Gabriela Esteves de Campos
- São José dos Campos : [s.n.], 2014.
144 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Instituto de Ciência e Tecnologia
de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.
Orientador: Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho

1. Osteoblastos. 2. Titânio. 3. Porosidade. 4. Citotoxicidade I. Carvalho, Yasmin
Rodarte. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP -
Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD15

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

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, 07 de Fevereiro de 2014.
E-mail: gabrielae.campos@gmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profª Titular Yasmin Rodarte Carvalho (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ. Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profª Drª Renata Falchete do Prado

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ. Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Luis Gustavo Oliveira de Vasconcellos

São José dos Campos, 07 de fevereiro de 2014.

DEDICATÓRIA

*A **Deus**, meu Senhor, que traçou meus caminhos e me colocou onde jamais poderia imaginar. É a rocha que me sustenta e me dá forças para seguir em frente. A Ele toda honra, toda a glória e todo louvor.*

*Aos meus pais, **Edson Aparecido de Campos** e **Marise Esteves Lima**, os responsáveis por tudo o que sou, e os primeiros a sonharem este sonho. Agradeço por todas as noites em claro, pelos conselhos e pelas sementes plantadas na minha vida. Graças a vocês elas encontraram uma terra fértil e agora estamos colhendo os frutos. Por todas as situações que passamos e pelas atitudes que demonstraram, minha admiração e amor incondicional só aumentam, e nossa união também. Vocês são minha inspiração, meu referencial de caráter e humildade. Minha gratidão é eterna. Amo vocês!*

*À minha irmã **Isabela Esteves de Campos**, agradeço pelo companheirismo, pela união e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Você é meu porto seguro, a minha certeza de que nunca estarei sozinha, com quem sempre posso contar. Obrigada. Eu te amo muito!*

*Ao meu marido **Rodrigo Pavanetti**, meu
companheiro, amigo e cúmplice. Obrigada por todo o apoio,
por tornar meus sonhos os seus sonhos, e por correr atrás
deles com tanta garra e determinação. Obrigada por estar ao
meu lado em todos os momentos, pela compreensão nas tantas
ausências durante este período. Não existem palavras que
expressem toda a gratidão que sinto. Esta conquista também
é sua, meu amor. Te amo!*

*À minha avó **Maria de Lourdes Barbosa
Esteves**, da qual tenho orgulho imenso. Agradeço por todo
apoio, suporte e amor que me dá, e também por ser tão
maravilhosa. Cada pequeno gesto seu é uma enorme
demonstração de carinho, e minha vida fica muito mais feliz.
Eu te amo muito!*

*Aos meus avós **Bartolomeu Esteves Lima,
Aparecido Rocha Campos e Odília Custódio Campos**, que não
estão mais aqui, porém me deram o que tenho de mais
precioso: minha família. Sou eternamente grata pelo legado
que deixaram, e pela melhor maneira com a qual me
ensinaram a viver: o exemplo. Amo vocês para sempre!*

*À minha bisavó **Alzira Lopes Barbosa**, que
ainda hoje nos ensina e nos faz enxergar a vida com muito
mais amor e bondade. Te amo, bisa!*

*Aos meus **tios, tias e primos**, que contribuem
diariamente para minha felicidade e não medem esforços
para ajudar. Tenho muito orgulho e agradeço pela
contribuição de cada um nesta conquista. Amo vocês!*

*Aos meus sogros **Benedito Carlos Pavanetti e
Hélia Maria Barbosa Sena Pavanetti**, por me acolherem
como filha. Amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

À minha grande amiga e orientadora, **Profª Tit. Yasmin Rodarte Carvalho**, com quem há sete anos tenho o privilégio de trabalhar, me inspirar e também responsável por grande parte da minha evolução profissional e pessoal. Obrigada pela oportunidade de conhecer a pesquisa científica, e pela honra de ser minha orientadora. Obrigada pela confiança, por acreditar em mim e por fazer o dia-a-dia tão agradável. Obrigada pelas conversas, conselhos, infinitos ensinamentos que me dedicou e sobretudo pelo exemplo de pessoa, caráter e profissional. Muito obrigada!

À **Profª Drª Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, fundamental em todas as etapas deste projeto. Agradeço pelo companheirismo, pela compreensão, por me ouvir e pela confiança depositada. Nestes anos que trabalhamos juntas tenho certeza que fui privilegiada por ter ao meu lado uma pessoa tão competente e dedicada e que se tornou uma grande amiga! Obrigada por tudo, Lu!

À **Profª Drª Renata Falchete do Prado**, que ao me conceder um grande voto de confiança foi a responsável pelo meu ingresso na iniciação científica e generosamente contribuiu em grande parte dos projetos que realizei até aqui. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, e por acreditar em mim. Agradeço também por sempre estar presente e pela boa vontade em auxiliar no que é preciso sempre que necessito. Muito obrigada!

À **UNESP - Univ Estadual Paulista**, na pessoa do diretor do **Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos**, **Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli** e do vice-diretor **Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara**, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação e pós-graduação.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**, na pessoa da coordenadora **Prof^a. Adj. Juliana Campos Junqueira**, pela amizade e pela dedicação a todos os discentes.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Alves Cairo**, chefe da Divisão de Materiais do IAE/CTA, pela confiança, incentivo e permissão para o desenvolvimento de parte desta pesquisa no AMR.

Ao **Prof. Dr. Warley David Kerbauy**, pela amizade, bom-humor, por sua receptividade e pela oportunidade de estágio-docência na Disciplina de Periodontia. Muito obrigada, professor!

À **Prof^a Dr^a Luciane Dias de Oliveira**, pela amizade, confiança e dedicação. Obrigada por tudo que me ensinou, pela receptividade, pelo companheirismo, preocupação e todo o tempo despendido nos procedimentos laboratoriais. Parte deste trabalho é mérito do que me ensinou. Muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Ivan Balducci**, por compartilhar seu vasto conhecimento estatístico, e por sempre me ajudar quando necessário. Obrigada.

Ao **Prof. Dr. Luis Gustavo de Oliveira Vasconcellos**, pelas críticas construtivas realizadas no Exame Geral de Qualificação e por aceitar fazer parte desta Banca.

À minha amiga e também aluna de mestrado **Evelyn Luzia de Souza Santos**, pelo companheirismo e amizade desde a graduação até hoje e em todas as etapas deste projeto. Obrigada pelo seu desprendimento e por compartilhar comigo seus conhecimentos em cultura celular. Tudo o que sei devo a você, muito obrigada!

Às alunas de iniciação científica **Fernanda Bastos Pereira Tessarin** e **Renata Silveira Sagnori**, pela amizade e intensa dedicação neste projeto, pela responsabilidade e maturidade que demonstraram ao desenvolver etapas importantes deste estudo. Obrigada, meninas!

Aos **meus amigos e alunos de mestrado e doutorado da Biopatologia Bucal**, pela grande amizade e companheirismo, e pelos ótimos momentos durante este tempo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (**FAPESP**) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

A todos os funcionários do DCTA – IAE/AMR,
pelo apoio, disponibilidade e auxílio inestimáveis durante a fase de confecção das ligas e das amostras utilizadas nesta pesquisa.

Aos funcionários do Biotério Central do Campus de Botucatu da Unesp, **Sr. José Rafael Franco** e **Sra. Sislaine Aparecida Balestrin Alquati** pela pronta colaboração na concessão dos animais para a realização deste projeto.

Aos secretários do Programa de Pós-graduação **Rosemary da Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka** e **Ivan Oliveira Damasceno**, pela atenção e auxílio.

A todos **os funcionários do Depto. de Biociências e Diagnóstico Bucal** pelo apoio e convívio diário durante este período.

Ao técnico **Walter Cruz**, pelo auxílio nas iniciações científicas, pela companhia e carinho. Obrigada!!

Aos técnicos **Sérgio Alves** e **Domingos** pela colaboração neste trabalho.

A todos os animais experimentais envolvidos neste projeto, o meu mais profundo respeito.

A **todos os meus amigos** que direta ou indiretamente contribuíram para que este objetivo fosse alcançado.

“Ora, a fé é a certeza daquilo que esperamos e a prova das coisas
que não vemos.

Hebreus 11:1

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | 15 |
| ABSTRACT..... | 17 |
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 22 |
| 2.1 Titânio e suas ligas..... | 22 |
| 2.2 Superfície Porosa..... | 29 |
| 2.3 Cultura Celular..... | 32 |
| 2.4 Produção de Fatores de Crescimento e Citocinas..... | 33 |
| 3 PROPOSIÇÃO..... | 36 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 37 |
| 4.1 Confeção das Amostras..... | 37 |
| 4.2 Análise Metalográfica em MEV..... | 43 |
| 4.3 Análise por EDS..... | 45 |
| 4.4 Animais..... | 45 |
| 4.5 Procedimentos de cultura celular..... | 46 |
| 4.5.1 Isolamento de células da linhagem osteoblástica e desenvolvimento de cultura primária osteogênica..... | 46 |
| 4.5.2 Proliferação celular..... | 50 |
| 4.5.3 Determinação da viabilidade celular..... | 51 |
| 4.5.4 Conteúdo de proteína total..... | 53 |
| 4.5.5 Atividade de fosfatase alcalina..... | 55 |
| 4.5.6 Produção de fator de crescimento e citocinas..... | 56 |

| | |
|---|------------|
| 4.5.7 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização..... | 58 |
| 4.6 Análise dos resultados..... | 60 |
| 5 RESULTADOS..... | 61 |
| 5.1 Análise Metalográfica em MEV..... | 61 |
| 5.2 Análise em EDS..... | 65 |
| 5.3 Proliferação Celular..... | 69 |
| 5.4 Determinação da viabilidade celular..... | 74 |
| 5.5 Conteúdo de proteína total..... | 78 |
| 5.6 Atividade de fosfatase alcalina..... | 83 |
| 5.7 Produção de fator de crescimento e citocinas..... | 86 |
| 5.7.1 Produção de TNF- α | 86 |
| 5.7.2. Produção de IL-6..... | 89 |
| 5.7.3 Produção de TGF- β | 93 |
| 5.8 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização..... | 97 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 102 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 128 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 129 |
| 9 ANEXO..... | 144 |

Campos GE. Ensaio de citotoxicidade osteoblástica em amostras porosas das ligas Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta e TiCP [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

Os eventos celulares e teciduais que ocorrem durante o processo de osseointegração são diretamente influenciados pela composição, morfologia e topografia do biomaterial. O titânio (Ti) e suas ligas são os materiais mais usados para este fim, já que sua elasticidade pode ser controlada pela confecção de poros e pela composição química da liga. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade das ligas TiCP (Titânio comercialmente puro grau 2), Ti-6Al-4V (titânio-alumínio-vanádio), Ti-13Nb-13Zr (titânio-nióbio-zircônio), Ti-35Nb (titânio-nióbio), Ti-35Nb-7Zr-5Ta (titânio-nióbio-zircônia-tântalo). Foram confeccionadas, por metalurgia do pó, 720 amostras em forma de discos de cada liga, as quais foram caracterizadas por espectroscopia por energia dispersiva (EDS) e análise metalográfica. Células osteogênicas obtidas da calvária de ratos neonatos foram cultivadas sobre as amostras de cada liga e avaliadas de acordo a proliferação celular (PC) (24 horas, 3 e 10 dias), viabilidade celular (VC) (3, 10 e 14 dias), conteúdo de proteína total (PT) e atividade da fosfatase alcalina (FA) (3 e 10 dias), produção de TGF- β 1, TNF- α e IL-6 e formação dos nódulos de mineralização (NM) (14 e 21 dias). Os resultados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5%. O EDS confirmou a presença dos elementos constituintes de cada liga. A análise metalográfica demonstrou que as amostras apresentaram estrutura com 42% de poros interligados de tamanhos variados. A PC foi maior aos 10 dias para Ti-13Nb-13Zr, com diferença estatística. A VC das novas ligas foi semelhante ao TiCP, com médias maiores que Ti-6Al-4V e diferença estatística aos 10 e 14 dias. PT aos 10 dias exibiu maior média e diferença estatística para Ti-35Nb-7Zr-5Ta. FA

apresentou diferença estatística entre Ti-6Al-4V(maior média) e TiCP e Ti-35Nb. As médias de NM foram maiores e diferentes estatisticamente aos 14 dias para Ti-35Nb-7Zr-5Ta e Ti-35Nb e aos 21 dias para as mesmas e Ti-6Al-4V. A produção de TNF- α , IL-6 E TGF- β foi semelhante entre as ligas e aumentou com o tempo de cultura. Concluiu-se que as ligas propostas não exibiram citotoxicidade e que Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb e Ti-35Nb-7Zr-5Ta foram semelhantes ou superaram as propriedades avaliadas em comparação com as ligas já consagradas Ti-6Al-4V e TiCP, apresentando grande potencial para emprego em implantes biomédicos.

Palavras-chave: Osteoblastos. Titânio. Porosidade. Citotoxicidade.

Campos GE. Cytotoxicity and osteoblastic assay on Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta and CPTi porous samples [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

Cellular and tissue events that occur during osseointegration process are directly influenced by composition, morphology and topography of the biomaterial. Titanium (Ti) and its alloys are commonly used for this purpose, since its elasticity can be controlled by porous topography and the chemical composition of the alloy. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of Commercially Pure Titanium grade 2 (CPTi), Ti-6Al-4V (Titanium-Aluminum-Vanadium), Ti-13Nb-13Zr (Titanium-Niobium-Zirconium), Ti-35Nb (Titanium-Niobium) and Ti-35Nb-7Zr-5Ta (Titanium-Niobium-Zirconium-Tantalum) alloys. For each studied alloy, 720 samples in the form of discs were made by powder metallurgy and characterized by means of Spectrophotometry of Dispersive Energy (SDE) and metallographic analysis. Osteogenic cells from the calvaria of newborn rats were cultured on the samples of each group and evaluated according to cell growth (CG) (24 hours, 3 and 10 days), cell viability (CV) (3, 10 and 14 days), total protein content (TP) and alkaline phosphatase activity (ALP) (3 and 10 days), production of TGF- β 1, TNF- α and IL-6 (7 and 14 days) and mineralized nodules formation (MN) (14 and 21 days). Data obtained was analysed by statistical ANOVA and Tukey's tests, with 5% significance level. SDE detected the presence of constitutive elements of each alloy. Metallographic analysis showed samples structure with 42% of linked and different-size pores. CG was higher at day 10 for Ti-13Nb-13Zr, with statistical difference. New alloys' CV were similar to CPTi, with higher averages than Ti-6Al-4V and statistical difference at days 10 and 14. TP at day 10 showed higher average and statistical difference to Ti-35Nb-7Zr-5Ta.

ALP exhibited statistical difference between Ti-6Al-4V (highest average) and CPTi and Ti-35Nb. MN were higher and different statistically at day 14 for Ti-35Nb-7Zr-5Ta e Ti-35Nb and at day 21 for the same plus Ti-6Al-4V. TNF- α , IL-6 and TGF- β production were similar to all studied alloys. It was concluded that proposed alloys did not exhibit cytotoxicity and Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb e Ti-35Nb-7Zr-5Ta were similar or exceeded evaluated properties in comparison with consecrated alloys Ti-6Al-4V and TiCP, showing great potential for biomedical implants employ.

Keywords: Osteoblasts. Titanium. Porosity. Cytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

O processo biológico de osseointegração, ou aposição de matriz óssea calcificada sobre a superfície de um biomaterial implantado, é fundamental para o sucesso dos implantes. Os biomateriais designam uma classe ampla de substâncias naturais e sintéticas que em contato, de forma permanente ou não, com tecidos e fluidos de seres vivos não causam efeitos deletérios ao organismo. A biocompatibilidade de um material é considerada ótima quando promove a formação de tecido sadio em sua superfície. (Park, 1980)

Na última década, a implantodontia tem se concentrado em estudos que direcionam e também viabilizam a mais rápida osseointegração dos implantes para uso ortopédico e dental, na tentativa de reduzir ou até eliminar o período de cicatrização óssea livre de carga funcional (Teixeira, 2004).

Dentre as várias linhas de pesquisa com este objetivo, as características topográficas da superfície do implante são consideradas relevantes pela grande influência na qualidade da osseointegração obtida (Li et al., 2005; Bhattarai et al., 2008; Rosa et al., 2008; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2010; Wazen et al., 2010) bem como as características do biomaterial do qual o implante foi produzido (Niinomi, 2003; Taddei et al., 2007; Bhattarai et al., 2008; Santos et al., 2008; Bottino et al., 2009;).

O TiCP é o material mais utilizado para produção de implantes cirúrgicos dentais, já a liga de Ti-6Al-4V é a mais usada para a confecção de implantes ortopédicos. Contudo, estes dois materiais apresentam inconvenientes como alto módulo de elasticidade e leve toxicidade, respectivamente. Assim, muitas ligas de Ti, especialmente do tipo β , isto é, sem elemento tóxico, estão sendo desenvolvidas e pesquisadas para a fabricação de implantes cirúrgicos.

Cultura primária ou sub-culturas de células osteogênicas podem ser utilizadas para avaliar a interação entre a célula e a superfície de amostras de ligas desenvolvidas para a confecção de implantes. Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura de estudos que utilizem células osteogênicas obtidas da calvária de ratos recém-nascidos para analisar o comportamento celular sobre amostras produzidas com as ligas de Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta. Em geral, os estudos utilizam células semelhantes a osteoblastos, como a linhagem SaOS2 e linhagem celular de fibroblastos, como L929. Segundo Franco et al. (2010), podem ser encontrados diferentes resultados da atividade osteoblástica quando se utiliza linhagem celular (MG63) ou células de cultura primária ou sub-culturas sobre espécimes de titânio. Tal diferença poderia ser resultante da ampla variação fenotípica/genotípica, um aspecto característico das células de cultura primária (Franco et al., 2010). Outro fator potencialmente importante para essa diferença, é a expressão de integrina, que pode variar durante a seqüência da diferenciação osteoblástica (Bennett et al., 2001). Conseqüentemente, isto afetaria interação entre a célula e a

superfície do material, uma vez que a cinética de adesão e espalhamento celular é diferente em distintos sistemas de cultura de células (Franco et al., 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Titânio e suas ligas

Os implantes intra-ósseos têm sido utilizados para substituição de órgãos e tecidos perdidos do corpo humano. Nas últimas décadas modificações na composição química, forma, tamanho e topografia dos implantes ortopédicos e odontológicos vêm sendo desenvolvidas, com o objetivo de otimizar o processo de osseointegração, viabilizando-os como forma ideal de tratamento (Niinomi, 2008b; Miura et al., 2011; Niinomi et al., 2012; Guo et al., 2013a).

O Ti apresenta comprovada biocompatibilidade e uma extraordinária combinação de propriedades, já que exhibe alta resistência à tração (200 a 700 MPa); baixo peso específico (densidade = 4,5 g/cm³ a 25 °C); alto ponto de fusão (1.688 °C); módulo de elasticidade compatível com tecidos orgânicos calcificados (110 GPa), porém não adequado; dureza Vickers entre 80 e 105, a qual varia de acordo com o grau de pureza do Ti; condutividade térmica 0.2 J/cm.K e expansão térmica $9:6 \times 10^{-7}$ K⁻¹ (Howard, Timothy, 1995; Callister, 2007). A limitação principal do titânio é a sua reatividade química com outros materiais a elevadas temperaturas. No entanto, alguns

metais, como o próprio Ti, o ferro (Fe), o níquel (Ni), o cromo (Cr) e muitas ligas destes metais, quando em contato com o ar, à temperatura ambiente, perdem a sua reatividade e se tornam extremamente inertes. Este fenômeno, denominado passividade, resulta na formação de uma película de óxido muito fina e altamente aderente sobre a superfície do metal, a qual serve como barreira protetora contra a corrosão adicional (Callister, 2007). Esta fina camada é formada principalmente por dióxido de Ti (TiO_2) e apresenta-se amorfa, insolúvel e muito estável, podendo voltar a se formar quando removida mecanicamente. Esta superfície oxidada é favorável já que minimiza o fenômeno de biocorrosão, que é uma característica importante para o uso do Ti como material de implante (Branemark, 1983; Kasemo, 1983; Park et al., 2008). Contudo, a grande vantagem dos materiais de Ti para o uso biomédico é que eles são completamente inertes e, portanto, representam uma excelente alternativa para pacientes que têm alergia ou reações tóxicas a vários outros metais (Park, 1980; Branemark, 1983; Kasemo, 1983).

À temperatura ambiente, o Ti puro apresenta-se na fase α , com estrutura cristalina hexagonal compacta (hcp), a qual se transforma alotropicamente na fase β , cúbica de corpo centrado (ccc). A adição de elementos químicos para a produção de uma liga visa basicamente à manutenção da fase α ou β , porém, muitas ligas de Ti apresentam os dois tipos de fase (Howard, Timothy, 1995; Callister, 2007; Niinomi, 2008a). As ligas de Ti tipo β estão sendo desenvolvidas visando não apenas melhorar a biocompatibilidade, uma vez que são compostas por elementos não tóxicos ou não

alergênicos (Niinomi, 2008b), mas também para exibir melhores propriedades mecânicas em relação ao osso. A fabricação de ligas de Ti com módulo de elasticidade similar ao do osso cortical tem sido extensivamente pesquisada (Niinomi, 2003; Taddei et al., 2007; Santos et al., 2008; Bottino et al., 2009) e já é conhecido que as ligas de Ti tipo β exibem menor módulo do que as ligas do tipo α ou tipo α e β (Niinomi, 2008b).

O titânio comercialmente puro (TiCP) e a liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) são as mais comumente utilizados para confecção de implantes metálicos, pois apresentam características biológicas e físico-químicas adequadas. Entretanto seus módulos de elasticidades (110 GPa – TiCP; 120 GPa - Ti-6Al-4V) são maiores que o módulo de elasticidade do osso (10-30 GPa) (Dewidar et al., 2006; Lemons, Dietsh-Misch, 2006; Biesiekierski et al., 2012). Sabe-se que devido a esta diferença entre o módulo de elasticidade dos materiais a transferência de estresse entre o implante e o osso pode não ser homogêneo. Assim, é desejável um material que apresente um módulo de elasticidade o mais próximo possível do osso (Oliveira et al., 2007).

Inicialmente, a liga de Ti de maior interesse e mais utilizada para implantes cirúrgicos, principalmente ortopédicos, foi a liga de titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) (Lemons, Dietsh-Misch, 2006), devido às suas favoráveis propriedades mecânicas, baixo custo, resistência à corrosão e boa tolerância do tecido (Eisenbarth et al., 2004). Por outro lado, esta liga apresenta módulo elástico de 120 GPa, aspecto que desfavorece o seu uso para implantes biomédicos

(Lemons, Dietsh-Misch, 2006). Entretanto, este problema foi amenizado pela fabricação de amostras porosas, que apresentaram módulo elástico entre 11 e 19 Gpa (Bhattarai et al., 2008). Embora o módulo elástico possa ser diminuído, a liga de Ti-6Al-4V ainda exhibe outros inconvenientes como a biodegradação do Al e V que gera produtos que podem reagir com os tecidos, induzindo a liberação de níveis aumentados de mediadores pró-inflamatórios e osteolíticos, os quais podem causar problemas como a perda do implante (Rogers et al., 1997). Além disso, observou-se a deposição de Al e V em tecidos, órgãos e fluidos corpóreos (Okasaki et al., 1998). O elemento V tem sido associado a possíveis efeitos citotóxicos e reações teciduais adversas. Já o Al, pode estar relacionado à inibição de crescimento ósseo e ao desencadeamento de distúrbios neurológicos (Khan et al., 1999). Adicionalmente, o potencial de contribuição do Al e V para a doença de Alzheimer e desordens respiratórias também tem sido pesquisado (Rogers et al., 1997).

Ligas de Ti tipo β , compostas de elementos não tóxicos e não alergênicos, tais como o nióbio (Nb), ferro (Fe), molibdênio (Mo), tântalo (Ta) e zircônio (Zr), entre outros, estão sendo desenvolvidas para utilização em implantes biomédicos (Niinomi, 2008b; Ning et al., 2010). O objetivo a ser alcançado é a produção de uma liga que reúna as propriedades de baixo módulo de elasticidade, excelente resistência mecânica, boa resistência à corrosão, fácil conformabilidade e ausência de elementos tóxicos (Taddei et al., 2007; Niinomi, 2008a; Santos et al., 2008; Ning et al., 2010; Wang et al., 2010). Entretanto, é importante ressaltar que há uma concentração

máxima de íons para cada um destes elementos, a fim de que eles não se tornem tóxicos. Esta mensuração foi avaliada por Li et al. em 2010, que utilizaram células semelhantes a osteoblastos (SaOS2) e concluíram que a concentração máxima para o molibdênio, titânio, nióbio e estanho deve ser respectivamente 8,5; 15,5; 172,0 e 37,000.0 microg/L.

Embora ainda seja aceitável o alto módulo de elasticidade, têm-se proposto novas ligas de titânio, com características de compatibilidade clínica e mecânica para aplicações biomédicas (Biesikierski et al., 2012). Estas ligas são baseadas na associação dos elementos Zr, Nb e Ta com o Ti e resultam em ligas que exibem uma combinação de elevada resistência mecânica com baixo módulo de elasticidade (Laheurte et al., 2010).

A liga de titânio-nióbio-zircônio (Ti-Nb-Zr) começou a ser comercializada como material de implantes ortopédicos (Song, 1999), já que suas propriedades mecânicas podem ser controladas por tratamentos térmicos e deformação a quente ou a frio. A liga Ti-13Nb-13Zr apresenta resistência mecânica da ordem de 1.300 MPa, alta resistência à corrosão e menor módulo elástico do que as ligas de Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb (Okasaki et al., 1998). Estudos *in vitro*, utilizando linhagem celular L929 (fibroblastos) (Bottino et al., 2009) e ISO 10993-5 (Wang et al., 2010), além de pesquisas *in vivo* demonstraram a biocompatibilidade e as propriedades de osseocondução desta liga (Bottino et al., 2009). Wang et al. (2009), desenvolveram promissoras estruturas porosas com a liga Ti-10Nb-10Zr para serem usadas como biomateriais. Estas amostras

apresentam módulo elástico de 5.6 GPa, quando exibem 57% de porosidade, excelente ductibilidade e adequada biocompatibilidade quando submetida ao teste de citotoxicidade utilizando células semelhantes a osteoblastos (SaOS2). Ning et al. (2010) avaliaram a influência do conteúdo do Zr em amostras densas confeccionadas com a liga Ti-35Nb-xZr sobre as propriedades mecânicas e a adesão celular (células da medula óssea). Os autores concluíram que a constituição Ti-35Nb-5Zr apresenta adequado módulo elástico, 65 GPa, e portanto, grande potencial para aplicações ortopédicas e dentais.

Com o objetivo de melhorar o módulo de elasticidade das ligas de Ti, também foi desenvolvida a liga de Ti-Nb-Zr-Ta (titânio-nióbio-zircônio-tântalo), que apresenta um dos menores módulos de elasticidade das ligas de Ti, como a Ti-29Nb-11Ta-5Zr com módulo de 20 Gpa (Laheurte et al., 2010). Além disso, a liga Ti-Nb-Zr-Ta exhibe boa resistência mecânica (Taddei et al., 2007; Niinomi, 2008a;) e adequada resistência à fadiga (Niinomi et al., 2003).

As ligas de Ti-Nb-Zr e Ti-Nb-Zr-Ta utilizam a propriedade do nióbio para reduzir o módulo de elasticidade e estabilizar a fase β do Ti (Song, 1999). Em 2008, Santos et al. desenvolveram a liga de Ti-35Nb, que apresenta uma microestrutura bifásica com predomínio da fase β . Esta liga apresenta valores de módulo elástico na faixa de 80 GPa e resistência à tração de 600 MPa, aspectos que caracterizam a liga como um material com potencial para aplicações biomédicas. Estes resultados foram obtidos com amostras densas, logo a utilização desta liga para a confecção de amostras com

superfície porosa pode conduzir a um material que apresente menor módulo de elasticidade associado com adequadas propriedades mecânicas. Adicionalmente, Wang et al. (2010) também concluíram que a liga de Ti-Nb pode ser utilizada para aplicação biomédica, após estudo de citotoxicidade com linhagem celular de fibroblastos L929.

Ainda que essas ligas apresentem propriedades mecânicas promissoras e compatibilidade biológica para utilização biomédica, uma das principais preocupações é a influência destes elementos metálicos no comportamento celular (Li et al., 2005).

Taddei et al. (2007) e Niinomi et al. (2003) avaliaram a citotoxicidade da liga Ti-Nb-Zr-Ta por meio de células de ovário de hamster e linhagem celular de fibroblastos (L929), respectivamente, e concluíram que esta liga não exibe citotoxicidade.

Em um estudo recente, Guo et. al. (2013a) avaliaram a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* da liga de Ti-35Nb-3Zr-2Ta, com módulo de elasticidade de 48 Gpa. Os testes *in vitro*, utilizando células osteoblásticas, demonstraram que esta liga não é citotóxica, uma vez que ocorreu proliferação celular e expressão gênica de proteínas ósseas como osteopontina e osteocalcina. Os resultados do estudo *in vivo* revelaram que não houve diferença entre a liga proposta e o grupo controle, constituído pela liga Ti-6Al-4V.

No estudo realizado por Saulacic et al. (2012), avaliando o crescimento ósseo nos períodos de 2, 4 e 8 semanas em implantes confeccionados com Ti CP, Ti-6Al-4V e Ti-Zr (15% de Zr), verificou-se que nos grupos de Ti-Zr e TiCP houve mais rápida osseointegração do que no de Ti-6Al-4V.

Assim, o desenvolvimento de diferentes ligas de Ti despertou um grande interesse na produção de biomateriais que apresentassem adequadas características físico-químicas e mecânicas, bem como ausência de potencial tóxico (Niinomi, 2003; Taddei et al., 2007; Bottino et al., 2009).

2.2 Superfície Porosa

Além do material de fabricação dos implantes, a confecção de porosidades na sua estrutura constitui alternativa que visa diminuir a diferença entre o módulo de elasticidade do biomaterial e do osso (Bottino et al., 2009; Laheurte et al., 2010). Assim, espera-se que a utilização de liga de titânio com menor módulo de elasticidade, combinada com a confecção de porosidade, conduza a um melhor resultado no desempenho do sistema osso-implante (Bhattarai et al., 2008)

A estrutura porosa deve ser confeccionada com alta porosidade para promover espaço suficiente para a adesão celular e posteriormente formação de novo osso, além de permitir o transporte de fluidos corpóreos, proliferação de nova vascularização e apresentar adequada propriedade mecânica para resistir aos esforços durante a implantação e utilização (Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008a; 2008b, 2010; Rosa et al., 2009; Wazen et al., 2010). No entanto, à medida que o aumento da porosidade e do tamanho dos

poros é importante para o crescimento de novo osso, este aumento pode diminuir as propriedades mecânicas do implante. O implante cirúrgico deve apresentar uma combinação de propriedades mecânicas suficiente para suportar os esforços, ao mesmo tempo em que deve exibir valores de módulo de elasticidade semelhante ao osso (Vasconcellos et al., 2010; Wazen et al., 2010).

Inúmeros estudos têm demonstrado que a porosidade dos implantes promove resultados positivos na neoformação óssea (Li et al., 2005; 2007; Brentel et al., 2006; Bhattarai et al., 2008; Vasconcellos et al., 2008a; Bottino et al., 2009; Faria et al., 2010; Wazen et al., 2010), uma vez que aumenta a área de contato entre o biomaterial e o tecido ósseo (Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008a) resultando na melhor estabilidade do implante ao longo do tempo (Wazen et al., 2010), além de acelerar o processo de osseointegração (Frosch et al., 2003). Além disso, esta superfície oferece uma solução atrativa para o problema da diferença de módulo de elasticidade entre o metal e o osso (Li et al., 2005).

Apesar da atividade de osteoblastos em amostras de titânio ser alterada positivamente pela superfície porosa, essas células também podem ser influenciadas pelo diâmetro dos poros. Nos poros de 300 μm de diâmetro, as células cruzam o lúmen por meio de filopodia, formando um padrão estrelado no poro (Frosch et al., 2003).

O estudo desenvolvido por Hsu et al (2013), demonstrou que o desenvolvimento de porosidade em ligas de titânio tem o potencial de proporcionar crescimento ósseo para o interior dos

poros, bem como de diminuir o módulo de elasticidade destes metais, visando equipará-lo ao do osso natural.

Concomitantemente, diversos estudos têm demonstrado que a superfície do implante pode modificar a expressão fenotípica e o metabolismo de células osteoblásticas. Experimentos com culturas celulares providenciam uma ferramenta útil para pesquisas, uma vez que as interações das células e matriz celular com a superfície do biomaterial podem ser avaliadas detalhadamente. Processos tais como adesão, motilidade, proliferação e diferenciação de células, bem como a biossíntese de proteínas podem ser investigados (Oliveira, Nanci, 2004; Beloti et al., 2006; Schwartz et al., 2007; Beloti et al., 2008; Rosa et al., 2009).

De acordo com Barbas et al. (2012), o controle da porosidade, do tamanho e da distribuição dos poros é decisivo para a obtenção de implantes com propriedades mecânicas próximas às do osso, e estes fatores garantirão a integração óssea e a melhor adaptação entre estruturas de diferentes módulos de elasticidade. Contudo, estes aspectos deveriam estar associados à necessidade crescente de reduzir custos de fabricação, principalmente no que se refere ao Ti. A técnica de metalurgia do pó é uma alternativa para se obter compostos metálicos de Ti de custo relativamente baixo e processos de compactação de amostras com alta produtividade, confeccionando materiais de boa propriedade mecânica. Adicionalmente, esta técnica possibilita a obtenção de peças com porosidade controlada e estrutura complexa com rede de poros interligados, aspectos que representam um fator importante para

melhorar e acelerar as características da osseointegração em implantes (Brentel et al., 2006; Taddei et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008a; 2008b, 2010; Rosa et al., 2009; Wang et al., 2009; Faria et al., 2010).

2.3 Cultura Celular

A compreensão dos eventos celulares e moleculares que ocorrem na interface célula-biomaterial nos implantes ósseos consiste no fator decisivo para que haja sucesso na cultura celular. A compreensão dos mecanismos envolvidos nos estágios iniciais das interações osteoblásticas com a superfície do material de implante é fundamental para garantir o futuro e a proliferação das células que entraram em contato com ele (Sista et al., 2011).

O comportamento das células quando em contato com um material é considerado decisivo para que este seja considerado biocompatível ou não, especialmente pela adesão celular à sua superfície. A compreensão das interações que ocorrem *in vitro* na interface material-células fornece subsídios para se criar condições ideais para o sucesso do implante *in vivo*. Assim, o entendimento da resposta celular é tão importante quanto a compreensão das propriedades físico-químicas do material.

Culturas de células primárias são produzidas a partir de células removidas de um tecido por processos de desagregação por métodos mecânicos, enzimáticos ou químicos. As culturas primárias

são, portanto, formadas a partir células que sobrevivem aos processos de desagregação, aderem-se ao substrato da garrafa de cultura (ou mantêm-se em suspensão) e proliferam. São células com morfologia idêntica à do tecido das quais se originam. Este tipo de cultura permite pouco número de divisões ou passagens celulares, após as quais entram em estado de senescência e morrem. Muitos pesquisadores preferem utilizar culturas primárias em seus experimentos uma vez que estas células mantêm as características fisiológicas do tecido de origem, podendo ser consideradas como representativas das condições naturais de um organismo (Sista et al., 2011).

De acordo com Variola et al. (2011), as células utilizadas para os estudos *in vitro* geralmente derivam-se de linhagens transformadas, e mesmo que apresentem fenótipo e características semelhantes, elas não necessariamente exibem a mesma bioatividade. As células que apresentam maior fidelidade com o comportamento e processo de cicatrização *in vivo*, onde são comumente encontradas em diversos estágios, são as células provenientes de culturas primárias.

2.4 Produção de fatores de crescimento e citocinas

A inserção de implantes metálicos está associada com possíveis alterações no equilíbrio entre as proteínas pró e anti-inflamatórias (Jakobsen et al., 2007).

O teste imunoenzimático (ELISA) é um bom método para a avaliação do desempenho dos biomateriais no que se refere à sensibilização e indução da produção de citocinas pelas células adjacentes. A concentração destas citocinas pode auxiliar ou não na integração do implante com o tecido ósseo (Jakobsen et al., 2007).

A resposta de diferentes células como macrófagos, fibroblastos e osteoblastos aos resíduos liberados pelos metais tem sido explorada visando elucidar os mecanismos em que ocorre o processo de perda asséptica dos implantes cirúrgicos. A osteólise é iniciada por resposta biológica a resíduos de biomateriais implantados (Kaufman et al., 2008). Kaufman et al. (2008) analisaram os níveis de nove mediadores, em cultura celular, para os resíduos de partículas de Ti-Al-V, Co-Cr e alumina. Entre os mediadores foram avaliados a interleucina-1 α (IL-1 α), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IL-6. Os autores concluíram que as partículas da liga de Ti-Al-V foram as mais estimuladoras, causando alta expressão das citocinas. Estas citocinas primárias estimulam a liberação de outros mediadores e sustentam a cascata inflamatória, uma vez que recrutam outras células e podem formar um granuloma peri-implantar (Jakobsen et al., 2007). Jakobsen et al. (2007) compararam o efeito das superfícies de ligas de Co-Cr-Mo e Ti-Al-V quando incubadas com macrófagos de ratos em cultura celular. Alterações de citocinas pró e anti-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 α , entre outros, e a produção de fatores como TGF- β e OPG foram determinados pelo método ELISA e também da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Os autores

concluíram que a liga de Co-Cr-Mo é a mais inerte, já que reduz a transcrição da citocina pró-inflamatória IL-6.

O estudo desenvolvido por Jakobsen et al. (2009) avaliou a produção de TGF- β e BMP-2 por macrófagos (linhagem J774A.1) cultivados sobre amostras de Ti-Al-V recobertas por hidroxiapatita (HA). Os resultados demonstraram que a presença da superfície porosa colaborou para maior produção de TGF- β , mas não de BMP-2, e que o recobrimento por HA não induziu aumento na secreção de tais citocinas. Desta forma, concluíram que a topografia da superfície pode desempenhar um papel central na secreção destas citocinas.

Posteriormente, o estudo realizado por Dalal et al. (2012) avaliou a expressão de IL-6, TNF- α , IL-8 por células humanas peri-implantares expostas a diferentes partículas de metais que compõem as ligas mais utilizadas em implantes biomédicos (liga de cobalto-cromo-molibdenio – Co-Cr-Mo; liga de titânio -Ti; liga de zircônio – Zr). Seus resultados revelaram que todos os metais induziram a produção de IL-6, TNF- α e IL-8. No entanto, as partículas provenientes da liga Co-Cr-Mo foram as mais tóxicas para os osteoblastos, diminuindo a viabilidade e proliferação destas células pela metade. As partículas de Ti e Zr foram as que menos induziram a produção das citocinas estudadas.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de células osteogênicas obtidas de calvária de ratos neonatos em contato com o TiCP e as ligas Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta , por meio dos testes de citotoxicidade: proliferação celular, viabilidade celular, conteúdo de proteína total, atividade da fosfatase alcalina, formação de nódulos de mineralização e análise de produção das citocinas TGF- β 1, TNF- α e IL-6.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP, sob o protocolo 018/2010-PA/CEP (Anexo A) e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.1 Confeção das Amostras

Inicialmente foram adquiridos os pós dos metais constituintes das ligas de Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta (Sigma-Aldrich) e também do pó de Ti puro grau 2 (TiCP), que serviu como grupo controle positivo para as ligas. Após esta etapa, teve início no Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial (DCTA) - Divisão de Materiais do Instituto de Aeronáutica e Espaço (AMR/IAE) a confecção das amostras pela técnica de metalurgia do pó. Os materiais utilizados para a fabricação das amostras foram os pós de cada uma das ligas associados à ureia,

aditivo orgânico que funcionou como espaçador, permitindo a confecção dos poros. A porosidade das amostras foi de 40% e os poros apresentaram diâmetro médio de 300 μm .

Cada metal foi pesado de acordo com a sua proporção presente na liga, e o pó de cada liga (Figura 1a) foi preparado pela mistura de seus componentes metálicos no misturador em Y com vibração (Powdermix) (Figura 1b), por 60 minutos. Após esta etapa, a ureia foi triturada e peneirada para que atingisse a faixa granulométrica de 177 a 250 μm . Posteriormente, a ureia e cada liga metálica (Figura 1c) foi misturada por 60 minutos no aparelho misturador Y (Treu S.A. 4/2L) (Figura 1d). Em seguida, 1 miligrama desta mistura foi inserida em uma matriz de aço cilíndrica (Figuras 1e e 1f), desenvolvida especialmente no AMR/IAE para a confecção dos discos. O conjunto formado pela matriz preenchida com a mistura de uréia e o respectivo pó foi conduzido para a compactação uniaxial com 100 MPa na prensa uniaxial (Marconi - MA 0981-C) (Figura 2a) e posteriormente para a prensa isostática a frio com 300 MPa (Paul Weber – Type Kip 100e) (Figura 2b). Em seguida, foi realizada a remoção da ureia em forno a vácuo (Thermosolda) (Figura 2c) com ciclo pré-determinado, iniciado à temperatura ambiente, e gradualmente aumentado até atingir 400 °C, visando à evaporação da uréia, sem que a mesma reagisse com o Ti. Posteriormente, as amostras foram sinterizadas no forno a vácuo com 10^{-7} toneladas (Termal Technology, modelo ASTRO) (Figura 2d), com taxa de aquecimento de 10 °C/minutos, e patamar de 1 hora na temperatura de 1200 °C para o TiCP e temperatura de 1400 °C para as demais ligas.



Figura 1 - **Confeção das amostras:** a) pó do Ti; b) misturador em Y (modelo Powdermix); c) Pós da liga pronta e uréia em grânulos; d) misturador em Y (modelo Treu); e) matriz montada; f) componentes da matriz.



Figura 2 - Equipamentos utilizados na confecção das amostras: a) prensa hidráulica uniaxial; b) prensa isostática; c) forno à vácuo para remoção da ureia; d) forno a vácuo para sinterização.

As amostras obtidas mediram 12 mm de diâmetro por 3 mm de altura (Figura 3). No quadro 1 estão descritos o número de amostras confeccionadas por liga e o número total:

Quadro1- Número de discos confeccionados para cada liga estudada

| Liga Metálica | N |
|------------------------|------------|
| TiCP | 156 |
| Ti-6Al-4V | 156 |
| Ti-13Nb-13Zr | 156 |
| Ti-35Nb | 156 |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 156 |
| TOTAL | 780 |

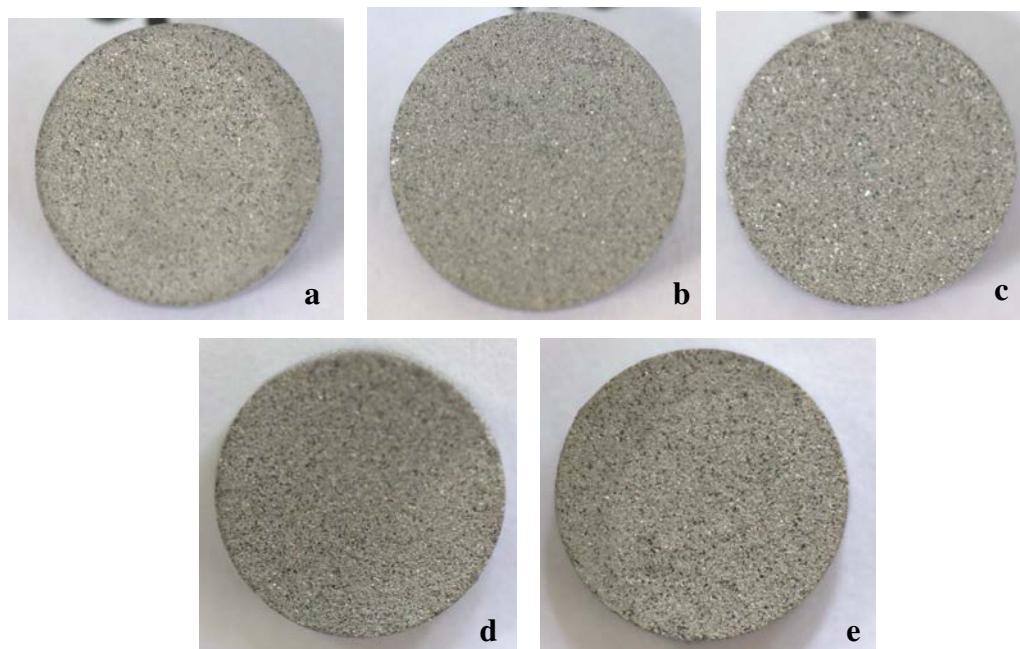


Figura 3 - Amostras: a) TiCP; b) Ti-6Al-4V; c) Ti-13Nb-13Zr; d) Ti-35Nb; e) Ti-35Nb-7Zr-5Ta.

A limpeza e higienização das amostras foi realizada em cuba ultrassônica (Schuster) com 4 ciclos de banhos de dez minutos cada, descritos abaixo:

- 1) Solução de água destilada e detergente neutro;
- 2) Água destilada pura;
- 3) Álcool 70°;
- 4) Água destilada pura.

Após limpas, as amostras foram armazenadas em estufa de secagem (Análogica - Modelo SP-100/A) por 6 horas a 35 °C, para eliminar toda umidade que pudesse servir como nicho de contaminações. Posteriormente, 4 amostras de cada grupo foram acondicionadas em placas de cultura de 24 poços (Cellstar, Corning, USA) (Figura 4), e enviadas para a Empresa Brasileira de Radiações Ltda – EMBRARAD para o procedimento de esterilização por radiação, onde foram submetidas a 20 KGY de radiação por 6 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata e para cada um deles foram utilizadas 4 amostras de cada liga.

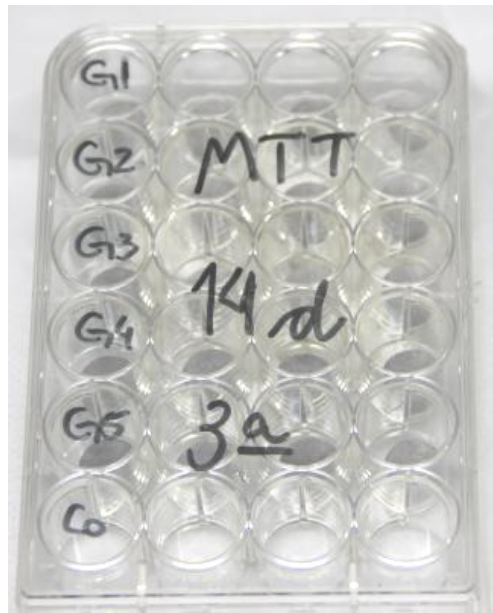


Figura 4 - Placa de cultura de 24 poços com 4 discos de cada grupo, dispostos horizontalmente.

4.2 Análise Metalográfica em MEV

Uma amostra de cada liga foi analisada através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Inspect S50 (FEI), localizado no Laboratório de Apoio a Pesquisa (LAP) do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese do Curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, Unesp, Campus de São José dos Campos. O equipamento operou em alto-vácuo com detector de elétrons secundários em voltagem de 12,5 HV e spot de 4,5.

A amostra foi avaliada superficial e internamente. Inicialmente foi realizada a caracterização da microtopografia

superficial, com aumento de 350X, a fim de avaliar qualitativamente a morfologia externa das amostras das ligas estudadas.

Em seguida, as amostras foram processadas para a realização da segunda etapa da análise metalográfica. As amostras foram posicionadas em um molde retangular de silicone e incluídas individualmente em resina poliéster orto cristal T 208. Após o endurecimento da resina, as peças incluídas foram fixadas na máquina de corte de tecido duro Labcut 1010 (EXTEC) para seu hemisseccionamento, de maneira longitudinal. Posteriormente, a face de corte dessas amostras foi polida em politriz Labpol 8-12 (EXTEC), utilizando lixas d'água 1200, discos de feltro (EXTEC), sílica coloidal (EXTEC) e pastas de diamante com granulometria de 1, 3 e 6 μ (Erios), resultando em blocos de inclusão livres de ranhuras.

Após esse processamento, todas as amostras foram novamente analisadas em MEV para a caracterização de sua morfologia interna. Adicionalmente, as amostras foram avaliadas e quantificadas quanto ao tamanho e porcentagem em área dos poros. Para isso, foram obtidas três imagens de cada amostra, com aumento de 100X, totalizando 3 imagens por liga. Posteriormente, essas imagens foram analisadas no programa *Image Tool* (versão Windows 3.0) e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva e ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%.

4.3 Análise por EDS

Para caracterização química das amostras, foi utilizado detector de espectrometria por espalhamento de energia (EDS), acoplado ao MEV, juntamente com o programa Spirit 1.9 (Bruker), que realizou a análise dos elementos químicos presentes em cada liga de Ti e sua quantificação.

4.4 Animais

Foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar), machos, recém-nascidos com 2 a 4 dias de vida (Figura 5). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Unesp – Campus de Botucatu.



Figura 5 - Ratos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) recém-nascidos, com 2 a 4 dias de vida.

4.5 Procedimento de cultura celular

Todos os procedimentos de cultura celular foram desenvolvidos e executados no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC), localizado no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, Unesp, Campus de São José dos Campos.

4.5.1 Isolamento de células da linhagem osteoblástica e desenvolvimento de cultura primária osteogênica

Quinze ratos Wistar recém-nascidos com 2 a 4 dias de vida foram utilizados em cada um dos três isolamentos de células necessários para a realização dos experimentos em triplicata.

Inicialmente, foi feita a assepsia com iodo das regiões de cabeça e pescoço do animal para que o mesmo pudesse ser posicionado sobre o campo cirúrgico estéril. A seguir, foi realizada a decapitação do animal utilizando navalha de micrótomo estéril (Leica). Foram removidos os tecidos da região e exposta a calvária, que foi cuidadosamente separada das demais estruturas da cabeça do animal (Figura 6). O fragmento ósseo foi limpo e iniciado o procedimento de isolamento celular.

As células osteogênicas foram isoladas por digestão enzimática seqüencial de fragmentos de calvária, com solução de tripsina a 0,25% (Gibco, Invitrogen, EUA) e colagenase tipo II a 0,1% (Gibco, Invitrogen, EUA), como descrito previamente (Oliveira, Nanci, 2004; Oliveira et al. , 2007; Schwartz et al. , 2007). As células foram plaqueadas sobre as amostras de titânio contidas em placas de poliestireno de 24 poços, na densidade de 2×10^4 células/poço. As células plaqueadas foram cultivadas por períodos de até 21 dias em meio essencial mínimo, modificação alfa, com L-glutamina (α -MEM, Gibco, Invitrogen, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen), 7 mM de beta-glicerofosfato (Sigma-Aldrich, EUA), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, USA) e 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco, Invitrogen, USA), à temperatura de 37 °C em atmosfera úmida de estufa contendo 5% de CO₂ (Sanyo). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscopia invertida em culturas crescidas sobre poços de poliestireno sem as amostras de titânio, as quais foram denominadas “controle”. Os procedimentos de isolamento celular estão ilustrados nas figuras de 7 a 10.

Foram realizadas 3 culturas celulares independentes, provenientes de 3 isolamentos celulares diferentes e independentes, sendo que em todas elas foram realizados os mesmos procedimentos, pelos mesmos períodos de cultura pré-determinados para cada teste.



Figura 6 - **Isolamento celular:** a) Remoção da calvária do rato neonato; b) Calvária removida



Figura 7 - **Isolamento celular:** Banho metabólico sob agitação.

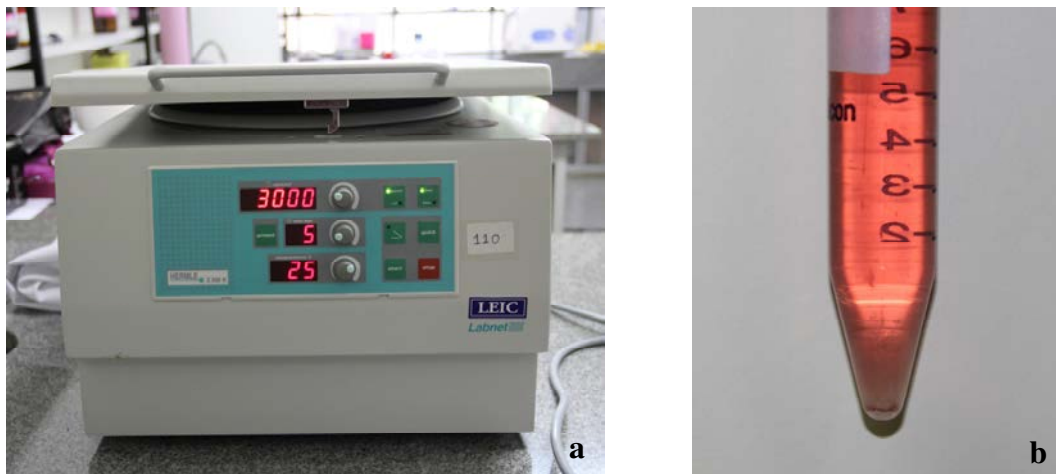


Figura 8 - **Isolamento celular** : a) Centrífuga; b) Obtenção de pellet contendo células osteogênicas.



Figura 9 - **Isolamento celular**: fluxo laminar preparado para o plaqueamento.



Figura 10 - **Isolamento celular:** a) Placa de cultura contendo as amostras, meio de cultura e células osteogênicas; b) Estufa de CO₂ na qual as placas são acondicionadas.

4.5.2 Proliferação Celular

Para a avaliação da adesão celular, as células foram cultivadas por 24 horas, 3 e 10 dias sobre as amostras. O meio de cultura foi removido e os poços lavados três vezes, com solução salina fosfato-tamponada (PBS) a 37 °C, para remoção de células não aderidas. As células aderidas foram enzimaticamente removidas das amostras com a utilização de 1 mM de EDTA e 0,25% de tripsina (Gibco, Invitrogen). As células foram coradas com azul de Tripán e somente as células vivas foram contadas pelo contador de células automático Countess® (Invitrogen). Os valores obtidos foram expressos em número total de células aderidas por poço (Figura 11).



Figura 11 - **Proliferação celular.** a) Placa para o teste de proliferação com solução de tripsina; b) Corante azul de Tripán 0,4%; c) Câmara de Neubauer; d) Contador de células.

4.5.3 Determinação da viabilidade celular

Este método foi baseado na avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico pela incubação com o

corante MTT [(brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol] (Sigma). O MTT é um sal, que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis, produzindo um produto formazan solúvel no meio de cultura, e então, efetua-se uma análise espectrofotométrica do corante incorporado. A quantidade de MTT, o marcador da viabilidade celular, incorporada pela população de células, é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura.

No teste de viabilidade celular foi utilizado como controle positivo solução de fenol a 0,2% e o controle negativo foi o grupo 1 constituído por amostras de Ti CP.

Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas em três períodos: 3, 10 e 14 dias. Alíquotas de MTT a 5 mg/mL em PBS foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas primárias com esta solução a 10% em meio de cultura por 4 horas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1 mL de PBS aquecido a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol e 134 µL de HCl) em cada poço sob agitação por 5 minutos em mesa agitadora orbital (Solab), para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços (Greiner) para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU). Os dados foram aferidos como absorbância (Figura 12).



Figura 12 - **Viabilidade Celular**. a) Placa para o teste de viabilidade celular; b) sal MTT; c) mesa agitadora orbital; d) leitor de microplaca.

4.5.4 Conteúdo de proteína total (PT)

O conteúdo de proteína total foi calculado após 3 e 10 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes, com PBS a 37 °C, e preenchidos com 2 mL de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich), para extração das proteínas. Após

30 minutos, 1 mL da solução de cada poço foi misturado com 1 mL da solução de Lowry (Sigma-Aldrich) e deixado por 20 minutos à temperatura ambiente. A esta mistura foi acrescentado 1mL de reagente de Folin e Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e deixado por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a absorbância foi aferida espectrofotometricamente a 680 nm (espectrofotômetro Micronal AJX 1900) e o conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva-padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13).

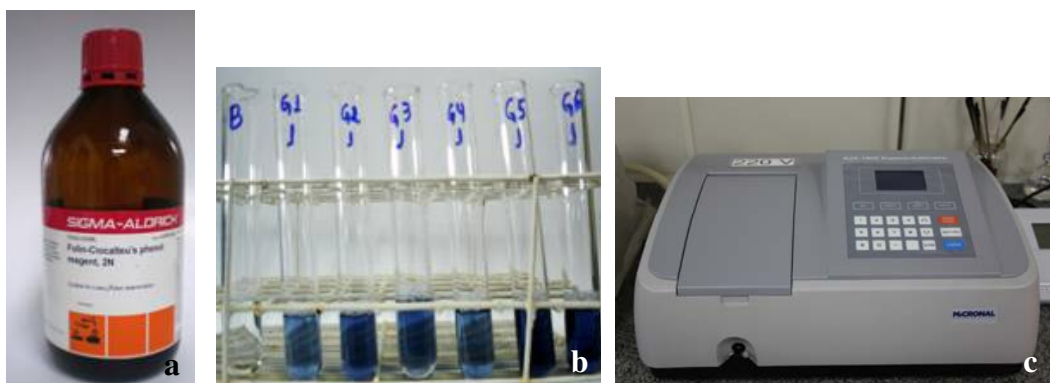


Figura 13 - **Avaliação do conteúdo de proteína total:** a) Reagente de Folin e Ciocalteu; b) tubos de ensaio contendo os reagentes; c) espectrofotômetro.

4.5.5 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada nos mesmos lisados utilizados para a avaliação do conteúdo de proteína total, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando *kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica) e também de acordo com Oliveira et al. (2007) e Schwatz et al. (2007). Inicialmente, 50 μ L de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1, por 2 minutos a 37 °C. À solução, foi acrescentada alíquota de 50 μ L dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37 °C. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 mL de Na₂CO₃ a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. Após 30 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina foi calculada a partir de curva-padrão usando a timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 μ mol de timolftaleína/hora/ μ g proteína (Figura 14).



Figura 14 - Avaliação da atividade da fosfatase alcalina: a) Kit comercial Labtest; b) tubos de ensaio contendo os reagentes e as alíquotas das amostras; c) espectrofotômetro.

4.5.6 Produção de fator de crescimento TGF- β 1 e citocinas TNF- α e IL-6

Ao final dos períodos de 7 e 14 dias os sobrenadantes foram coletados dos poços, distribuídos em microtubos e estocados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A quantificação de TGF- β 1, TNF- α e IL-6 foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA). Para tanto, placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-TGF- β 1, anti-TNF- α ou anti-IL-6 de rato (R & D Systems). As placas foram mantidas *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas com

tampão (PBS com 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 300 μL de tampão de bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina) por 1 hora à temperatura ambiente. Após, foram lavadas e receberam 100 μL dos sobrenadantes da cultura de células e 100 μL dos padrões das citocinas ou do fator de crescimento (TGF- β 1, TNF- α ou IL-6), que representou a curva-padrão. Os testes foram realizados em duplicata e as placas foram mantidas por 2 horas à temperatura ambiente. Após, as placas foram lavadas e foram acrescentados 100 μL de anticorpos de detecção anti-TGF- β 1, anti-TNF- α ou anti-IL-6 de rato marcados com biotina. Após 2 horas, foi acrescentada estreptoavidina (100 μL /poço) e as placas foram mantidas por 20 minutos cobertas com papel alumínio para evitar luz direta. Após lavagem, a reação foi revelada com 100 μL /poço de solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. Após 20 minutos, foram adicionados em cada poço 50 μL de solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N) e as densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek EL808IU) com comprimento de onda de 450 nm (Figura 15).

Os níveis de TGF- β 1, TNF- α ou IL-6 foram obtidos em densidade óptica e posteriormente convertidos em pg/mL.

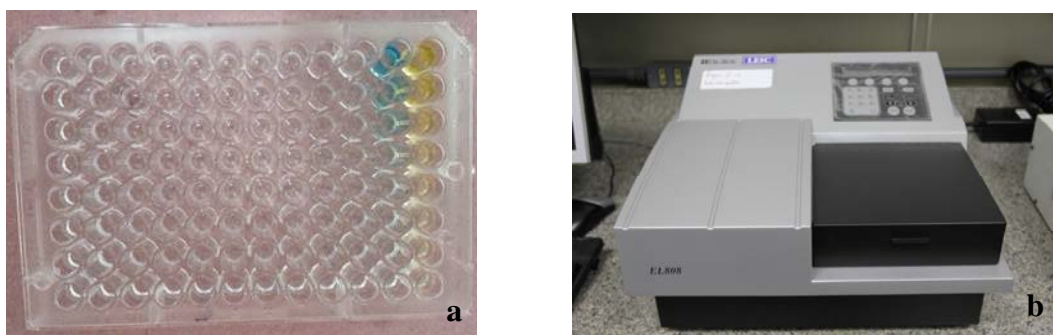


Figura 15 - **Reação de ELISA:** a) Placa de 96 poços com amostras e ácido sulfúrico (solução *stop*); b) leitor de microplaca.

4.5.7 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização

A formação de nódulos de mineralização foi avaliada após 14 e 21 dias de cultura. Para tanto, as células aderidas foram fixadas em solução de formol 10% por 2 horas à temperatura ambiente. Após fixação, as amostras foram desidratadas com uma série gradual de álcool e coradas com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich), pH 4,2 por 10 minutos. O corante vermelho de Alizarina S cora áreas que são ricas em cálcio.

A quantificação das formações mineralizadas foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory et al. (2004). Para tanto, 800 μ L de ácido acético 10% foi adicionado a cada um dos poços contendo as amostras e incubados em temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos. Após este período, cada uma das amostras foi raspada com auxílio de uma ponteira, para a remoção de maior quantidade de corante. Todo conteúdo de cada um dos poços foi transferido para microtubos de centrífuga com 1,5 mL e agitados em vórtex (Vertex QL – 901) por 30 segundos. Os microtubos foram levados ao banho-maria (Banho Metabólico Dubnoff – MA- 095/CF) e aquecidos por 10 minutos, a 85 °C sendo posteriormente transferidos para um becker com gelo por 5 minutos. A seguir foram centrifugados (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K) por 20 minutos e 100 μ L dos sobrenadantes foram transferidos para placa de 96 poços. Em cada poço foram acrescidos 40 μ L de hidróxido de amônia a 10%, para neutralização do ácido. A leitura foi realizada em leitor de microplaca

(Biotek – EL808IU), sob o comprimento de onda de 405 nm (Figura 16)

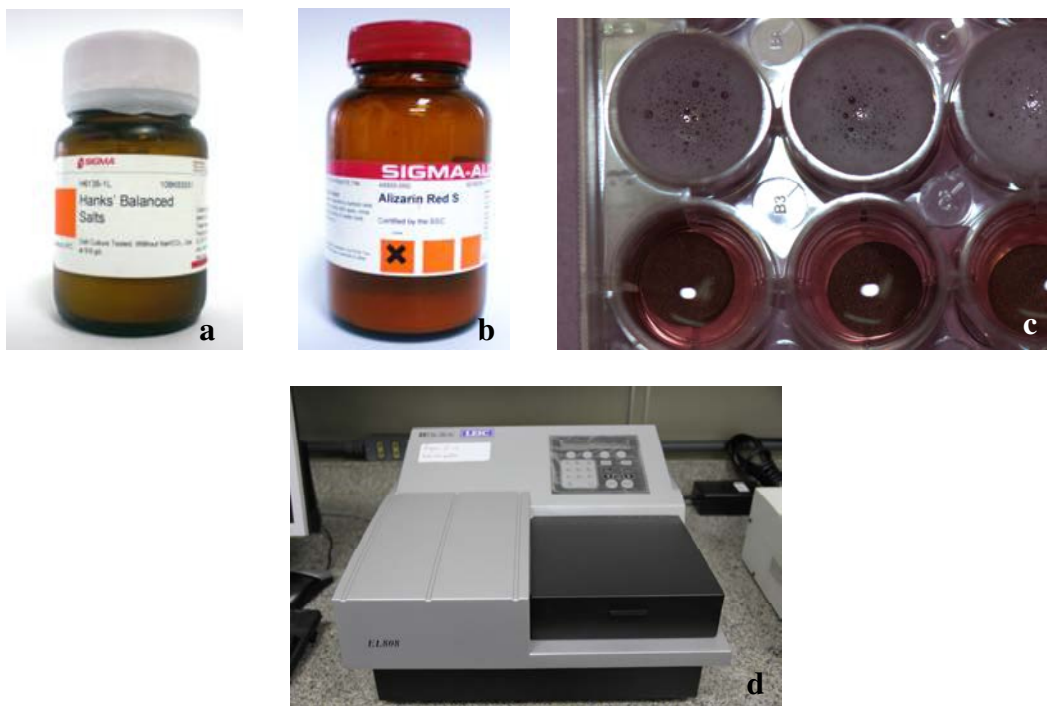


Figura 16 - Avaliação da formação e quantificação de nódulos de mineralização: a) Sal de Hank's; b) corante vermelho Alizarina S; c) amostras com ácido acético: acima amostras raspadas e homogenizadas; abaixo poços ainda não raspados; d) leitor de microplaca.

4.6 Análise dos resultados

Para a análise metalográfica, as imagens obtidas foram analisadas no programa Image Tool (versão Windows 3.0) e os dados resultantes foram submetidos à análise estatística descritiva e ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%.

Os dados numéricos dos procedimentos de cultura celular para os testes de proliferação celular, viabilidade celular,

conteúdo de proteína total, atividade da fosfatase alcalina, expressão de citocinas TGF- β 1, TNF- α e IL-6 e quantificação dos nódulos de mineralização foram analisados estatisticamente utilizando o teste de variância ANOVA dois fatores, e quando necessário, foi usado o teste de comparação múltipla de Tukey, com nível de significância de 5%.

Os resultados descritos foram representativos de 3 culturas primárias distintas para cada avaliação.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Metalográfica em MEV

Na análise metalográfica, realizada por MEV, com aumento de 350 X, foi possível caracterizar as amostras confeccionadas, de acordo com sua morfologia superficial. Para análise da morfologia interna foi utilizado o aumento de 1000 X.

Na análise da microtopografia externa das amostras do TiCP e das ligas Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta, foi possível observar a presença de uma superfície caracteristicamente porosa (Figura 17). Os cinco tipos de amostras estudadas apresentaram poros com tamanhos e formatos variados, sendo a maioria deles interconectados. Foram visualizados dois tipos de poros: os microporos e os macroporos. Os microporos eram pequenos e isolados, oriundos da porosidade residual do processo de sinterização presente na técnica de metalurgia do pó, enquanto que os macroporos eram abertos e interligados, provenientes da porosidade confeccionada pela adição da ureia. Na análise da microtopografia interna de todas as ligas estudadas foi possível confirmar a variabilidade no formato dos poros e sua interconexão, fator responsável pelo espriamento e crescimento celular que atingem até os poros mais centrais da amostra, com consequente deposição de matriz mineralizada (Figura 18).

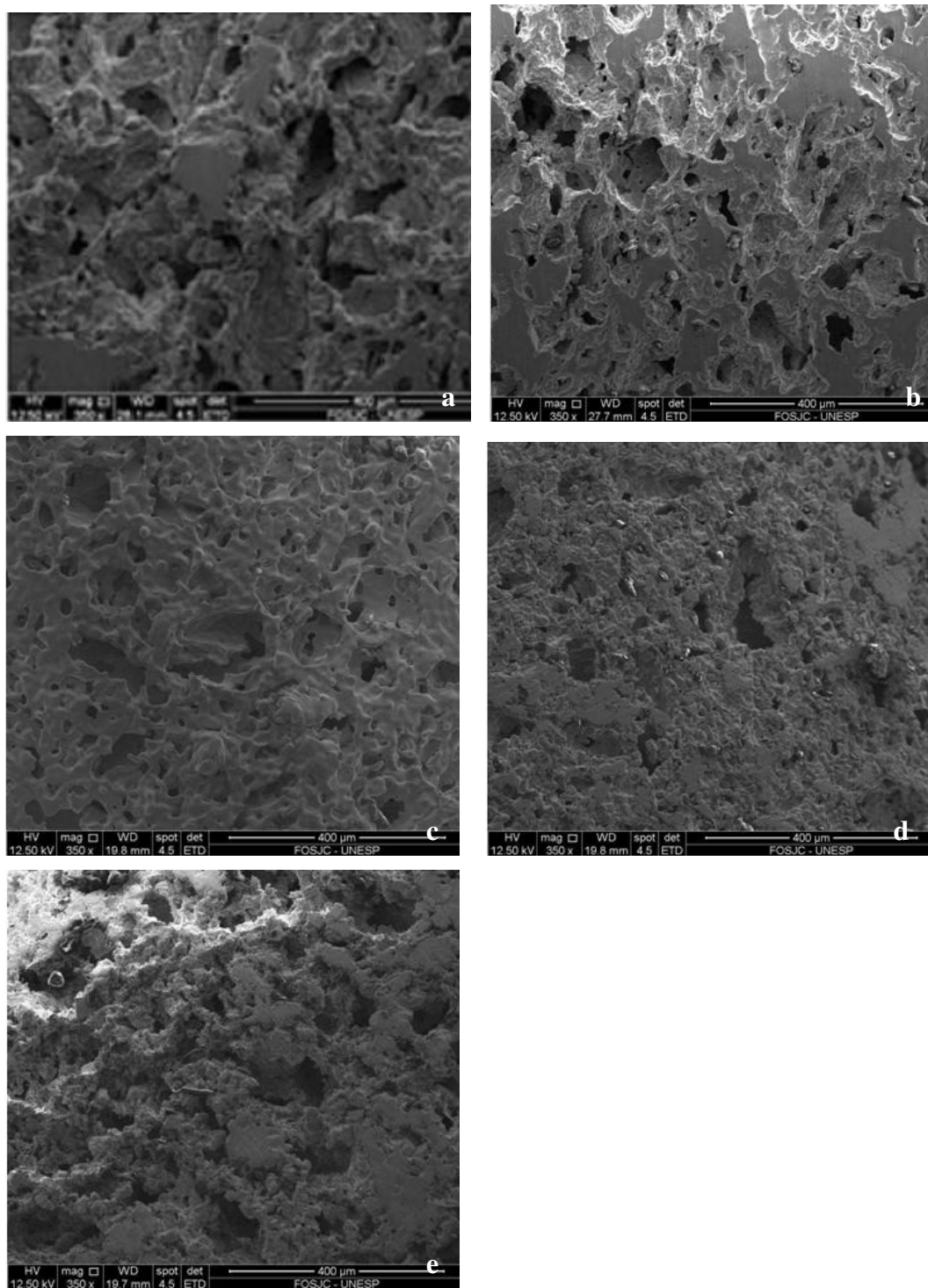


Figura 17 – Fotomicrografia de MEV da superfície com aumento de 350 X. a) TiCP; b) liga Ti-6Al-4V; c) liga Ti-13Nb-13Zr; d) liga Ti-35Nb; e) liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta.

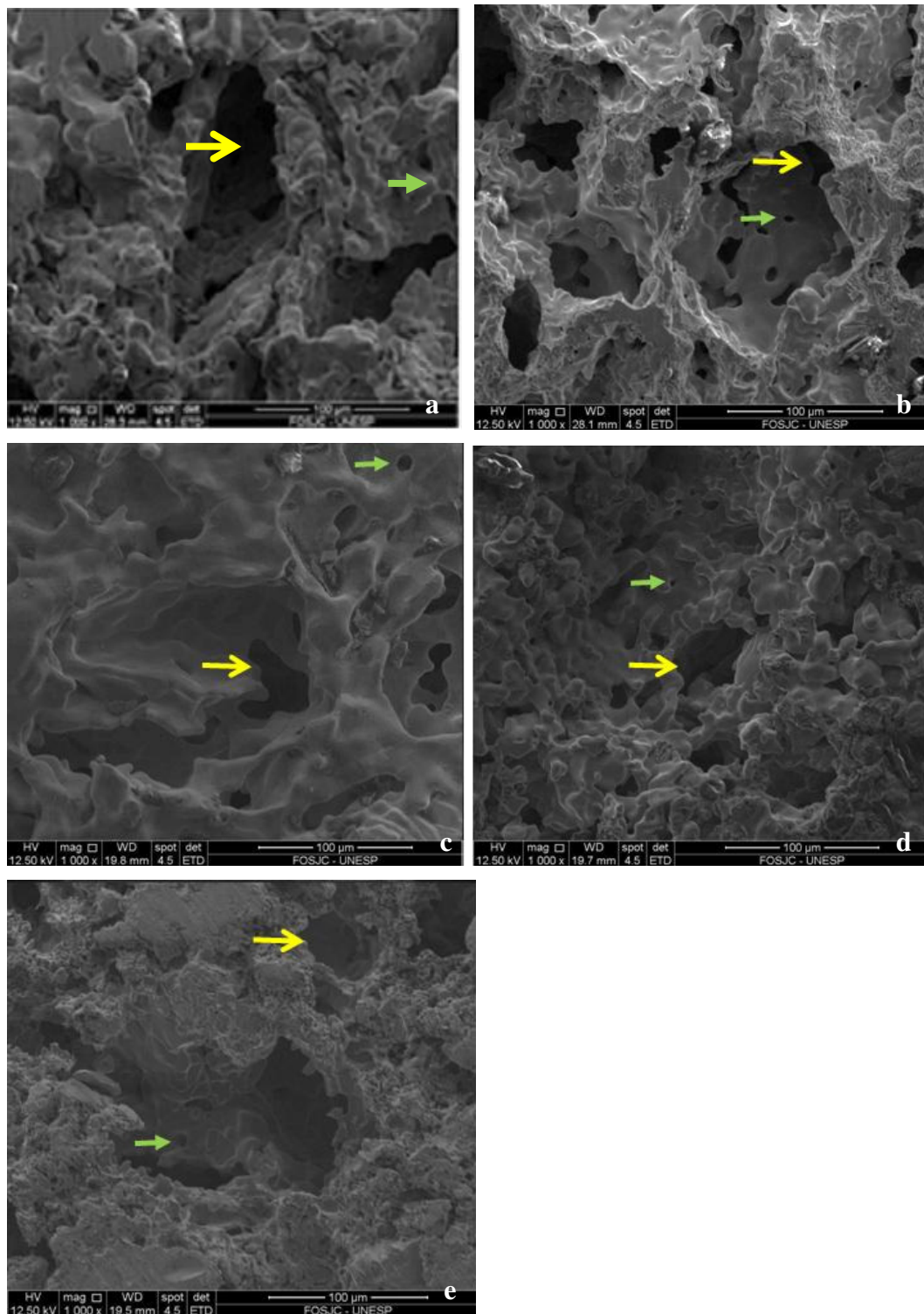


Figura 18 – Fotomicrografia de MEV do interior das amostras, com aumento de 1000 X, (→) indicam macroporos e (→) indicam microporos. a) TiCP; b) liga Ti-6Al-4V; c) liga Ti-13Nb-13Zr; d) liga Ti-35Nb; e) liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta.

Por meio do programa *Image Tool* (versão Windows 3.0), as imagens obtidas na caracterização da microtopografia interna foram analisadas. Os dados encontrados foram submetidos à análise estatística descritiva, para a realização do cálculo do tamanho e porcentagem em área de poros existentes nos dois tipos de implantes porosos.

A estatística descritiva do tamanho e porcentagem de poros está descrita nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos dados do tamanho de poros (μm)

| Liga | Média | Desvio Padrão |
|-----------------|--------|---------------|
| TiCP | 113,48 | 24,44 |
| Ti-6Al-4V | 104,1 | 16,16 |
| Ti-13Nb-13Zr | 105,00 | 23,37 |
| Ti-35Nb | 72,87 | 8,53 |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 102,7 | 15,68 |

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos dados da porcentagem de poros (%)

| Liga | Média | Desvio Padrão |
|-----------------|--------|---------------|
| TiCP | 40,248 | 4,720 |
| Ti-6Al-4V | 38,744 | 3,866 |
| Ti-13Nb-13Zr | 43,090 | 4,458 |
| Ti-35Nb | 42,166 | 11,666 |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 45,764 | 4,144 |

Para melhor interpretação destes dados metalográficos foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. Com relação à tamanho dos poros não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos ($p = 0,0521$), sendo assim, o valor médio de $99,53 \mu\text{m}$ foi considerado o tamanho dos poros das amostras. Da mesma forma, a porcentagem de poros também não configurou diferença estatística significativa ($p = 0,1043$), sendo que a média de porcentagem de poros entre os as ligas foi de 42%.

5.2 Análise por EDS

Na análise por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) uma amostra de cada liga foi analisada para verificar seus elementos químicos constituintes e sua quantificação. A microanálise semiquantitativa mostrou os principais íons metálicos que compõem cada liga proposta.

O difratograma relativo à amostra de Titânio puro revelou um pico correspondente ao metal constituinte, o Ti (Figura 19).

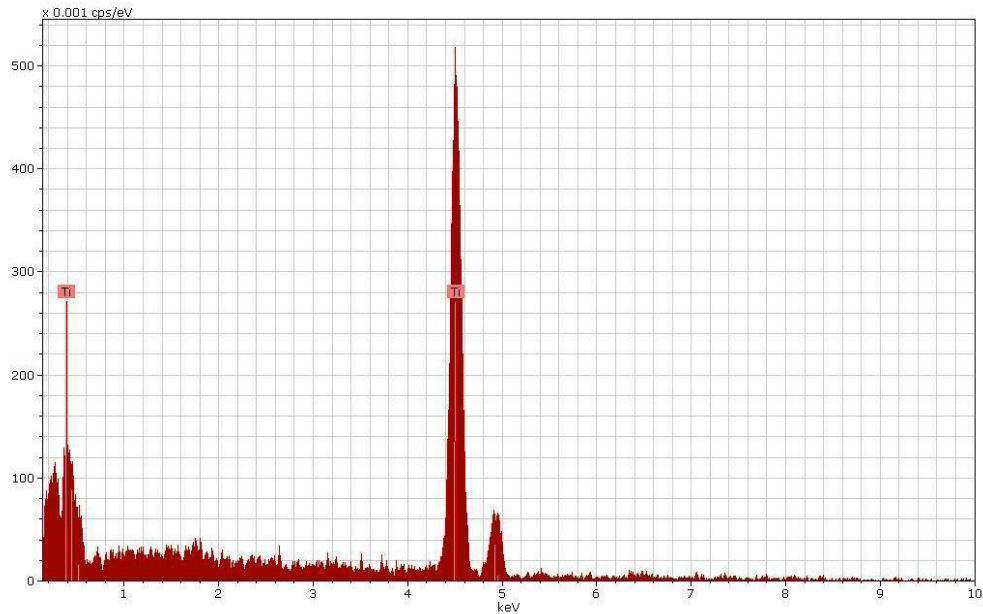


Figura 19 - Difratoograma da microanálise por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) da amostra de TiCP.

No difratograma da amostra Ti-6Al-4V foram observados picos referentes a todos os elementos constituintes desta liga (Figura 20).

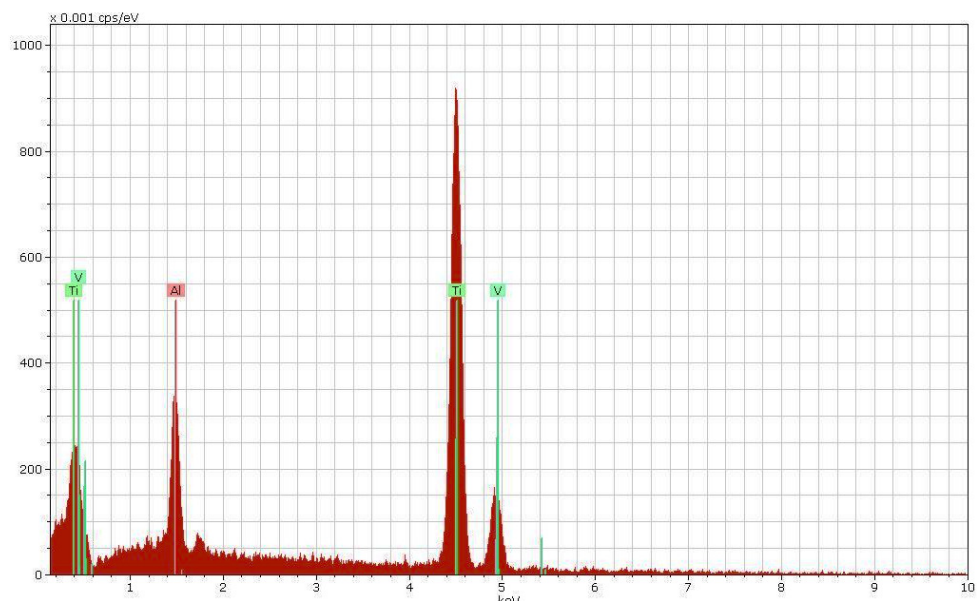


Figura 20 - Difratoograma da microanálise por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) da amostra de TI-6Al-4V.

Na análise correspondente à liga Ti-13Nb-13Zr foi possível observar o pico dos 3 elementos, Ti, Nb, Zr, além de suas quantificações (Figura 21).

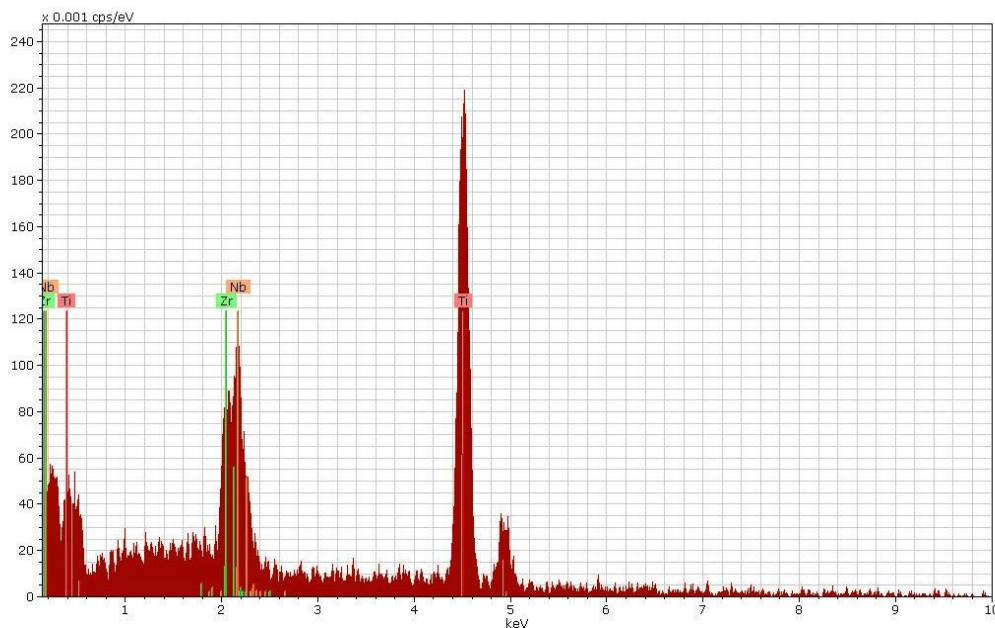


Figura 21 - Difratograma da microanálise por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) da amostra de TI-13Nb-13Zr.

Da mesma forma, no difratograma da amostra confeccionada a partir da liga Ti-35Nb, foi possível observar os picos dos elementos Ti e Nb e as suas quantificações (Figura 22).

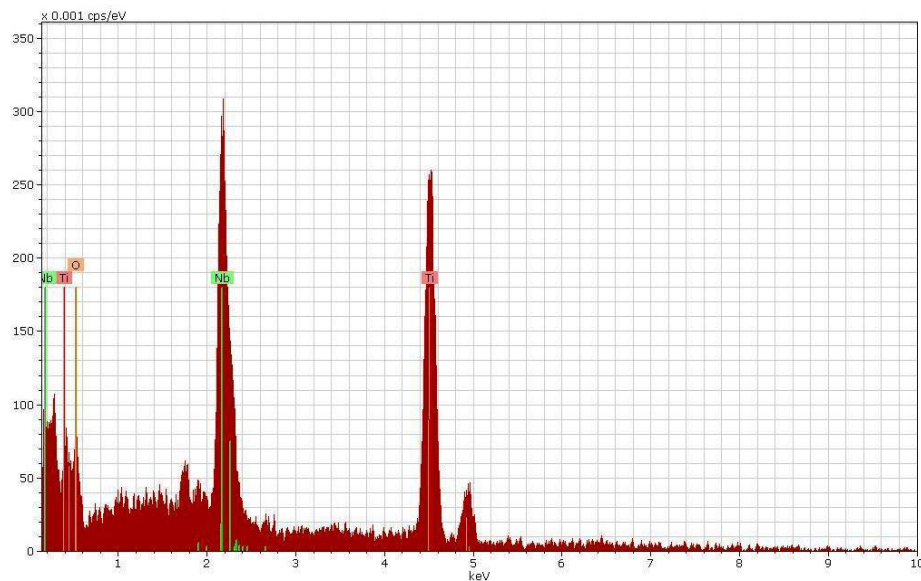


Figura 22 - Difratoograma da microanálise por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) da amostra de TI-35Nb.

No difratograma da amostra de Ti-35Nb-7Zr-5Ta foram observados picos referentes aos metais que compõem desta liga (Figura 23).

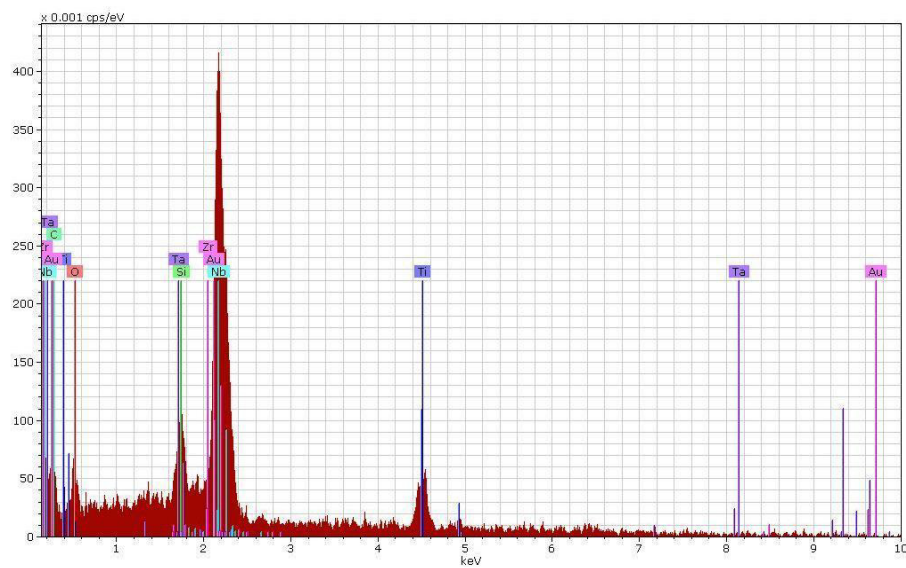


Figura 23 - Difratoograma da microanálise por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) da amostra de TI-35Nb-7Zr-5Ta.

5.3 Proliferação Celular

A influência das cinco diferentes composições das amostras: TiCP, Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta sob três diferentes tempos cultura (24 horas, 3 e 10 dias) sobre a proliferação celular constituíram quinze condições experimentais a serem estudadas (5 x 3). A estatística descritiva das mesmas é apresentada na tabela 3 e representada na figura 24 mostrada a seguir.

Tabela 3 - Média (\pm desvio padrão) dos dados de proliferação celular (número de células $\times 10^4$ /poço) obtidos sobre ligas de Ti e ação do tempo de cultura celular

| Proliferação Celular | TiCP | Ti-6Al-4V | Ti-13Nb-13Zr | Ti-35Nb | Ti-35Nb-7Zr-5Ta | Controle |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 24 horas | 13,81 \pm 1,9 | 9,54 \pm 2,61 | 13,94 \pm 4,05 | 12,06 \pm 3,95 | 12,33 \pm 4,96 | 4,83 \pm 1,93 |
| 3 dias | 10,25 \pm 3,41 | 13,08 \pm 5,65 | 10,14 \pm 3,06 | 11,44 \pm 6,56 | 10,63 \pm 6,76 | 6,25 \pm 2,78 |
| 10 dias | 16,04 \pm 2,84 | 13,08 \pm 5,71 | 21,15 \pm 8,56 | 29,04 \pm 8,08 | 19,69 \pm 9,89 | 11,58 \pm 2,23 |

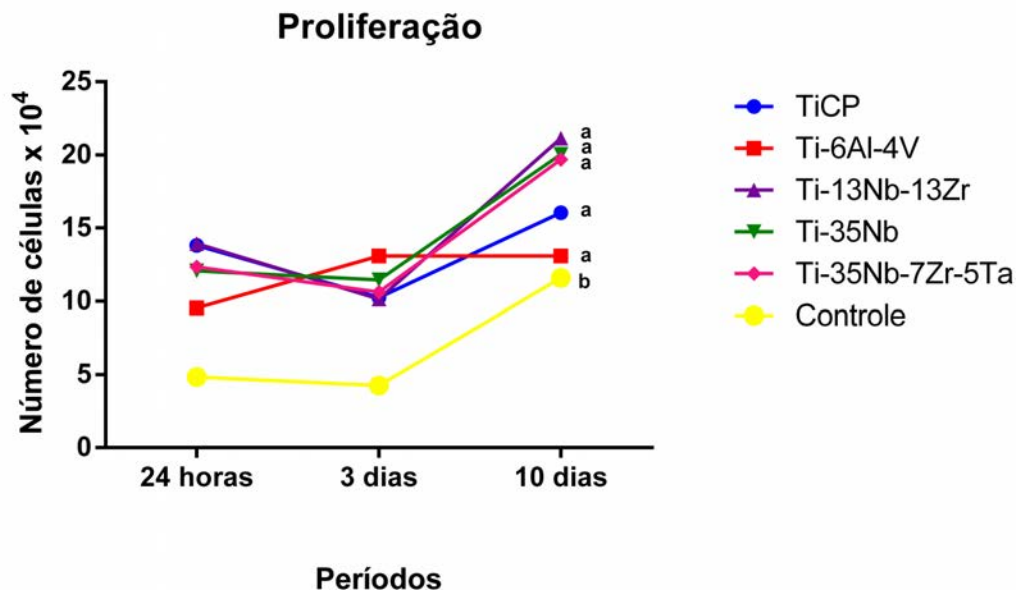


Figura 24 - Gráfico representativo da proliferação celular de osteoblastos em número de células $\times 10^4$ /poço em cada liga nos vários períodos. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

A partir dos dados obtidos na estatística descritiva foi possível verificar que às 24 horas de cultura celular as ligas apresentaram médias semelhantes, enquanto que o poço controle foi o que obteve a menor média. No período de 3 dias de cultura celular, no entanto, a liga Ti-6Al-4V demonstrou crescimento no número de células por poço, enquanto as demais ligas e o controle poliéstero apresentaram decréscimo em suas médias. Este fato não se repetiu no terceiro período avaliado, de 10 dias, pois a liga Ti-6Al-4V apenas manteve sua média, enquanto o TiCP e todas as demais apresentaram crescimento representativo.

Para determinar a influência das variáveis: liga de Ti e tempo cultura celular foi aplicado o teste estatístico ANOVA dois fatores, representado na tabela 4. A análise revelou que as ligas, o

tempo de cultura e a interação entre esses dois fatores apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Tabela 4 - Resultados do teste estatístico ANOVA dois fatores para os dados de proliferação celular, tendo como variáveis a liga de Ti e o tempo de cultura celular

| | Grau de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F | p |
|-----------|-------------------|--------------------|----------------|-------|--------|
| Liga | 5 | 1394,98 | 278,997 | 10,00 | 0,000* |
| Período | 2 | 1890,08 | 945,040 | 33,87 | 0,000* |
| Interação | 10 | 577,37 | 57,737 | 2,07 | 0,029* |
| Erro | 198 | 5524,78 | 27,903 | | |
| Total | 215 | 9387,21 | | | |

*diferença estatisticamente significativa

De acordo com os dados estatísticos providos pelo teste ANOVA, pôde-se afirmar que a influência isolada da liga de titânio ($p = 0,000$), do período de cultura celular ($p = 0,000$) e a interação de ambos os fatores constituíram diferença estatística significativa.

A comparação múltipla pelo teste de Tukey revelou a formação de dois grupos homogêneos conforme a liga estudada, sendo que o grupo controle configurou a menor média, e ficou isolado num único grupo homogêneo, como pode ser verificado na tabela 5:

Tabela 5 - Teste de Tukey para os dados de proliferação celular, fixando-se a composição da liga

| Grupo | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|--------|-------------------|
| Ti-13Nb-13Zr | 15,076 | A |
| Ti-35Nb | 14,514 | A |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 14,215 | A |
| TiCP | 13,368 | A |
| Ti-6Al-4V | 11,903 | A |
| Controle | 7,556 | B |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

O tempo de cultura celular configurou diferença estatística significativa, e a distribuição pelo Teste de Tukey revelou a presença de dois grupos homogêneos distintos, sendo que o período de 10 dias apresentou a maior média (Tabela 6).

Tabela 6 - Teste de Tukey para os dados de proliferação celular, fixando-se o período de cultura celular

| Período | Média | Grupos Homogêneos |
|----------|--------|-------------------|
| 10 dias | 16,931 | A |
| 24 horas | 11,087 | B |
| 3 dias | 10,299 | B |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

O resultado do teste de Tukey para a interação entre liga e tempo de cultura demonstrou que a liga Ti-13Nb-13Zr aos 10 dias constituiu a maior média, porém só diferiu estatisticamente da

liga Ti-6Al-4V e do controle no mesmo período. Este fato também se repetiu no período de 24 horas, quando a liga Ti-13Nb-13Zr só foi diferente estatisticamente do grupo controle. No período de 3 dias, no entanto, a liga Ti-6Al-4V representou a maior média, porém sem diferir estatisticamente de qualquer outra liga (Tabela 7).

Tabela 7 - Teste de Tukey para os dados da interação entre liga e períodos de cultura celular para a proliferação celular

| Grupo | Período | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|---------|--------|-------------------|
| Ti-13Nb-13Zr | 10 | 21,146 | A |
| Ti-35Nb | 10 | 20,042 | AB |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 10 | 19,688 | ABC |
| TiCP | 10 | 16,042 | ABCD |
| Ti-13Nb-13Zr | 24 | 13,938 | ABCD |
| TiCP | 24 | 13,813 | ABCD |
| Ti-6Al-4V | 3 | 13,083 | BCDE |
| Ti-6Al-4V | 10 | 13,083 | BCDE |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 24 | 12,333 | CDEF |
| Ti-35Nb | 24 | 12,062 | DEF |
| Controle | 10 | 11,583 | DEF |
| Ti-35Nb | 3 | 11,438 | DEF |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 3 | 10,625 | DEF |
| TiCP | 3 | 10,250 | DEF |
| Ti-13Nb-13Zr | 3 | 10,146 | DEF |
| Ti-6Al-4V | 24 | 9,542 | DEF |
| Controle | 3 | 6,250 | EF |
| Controle | 24 | 4,833 | F |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

5.4 Viabilidade Celular

A influência das cinco diferentes composições das amostras: TiCP, Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta, sob três diferentes tempos de cultura (3, 10 e 14 dias) sobre a viabilidade celular constituíram quinze condições experimentais a serem estudadas (5 x 3). A estatística descritiva das mesmas é apresentada na tabela 8 e representada na figura 25 mostrada a seguir.

Tabela 8 - Média (\pm desvio padrão) dos dados de viabilidade celular (densidade óptica – 570nm) obtidos sob ligas de Ti e ação do tempo de cultura celular

| Viabilidade Celular | TiCP | Ti-6Al-4V | Ti-13Nb-13Zr | Ti-35Nb | Ti-35Nb-7Zr-5Ta | Controle |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 3 dias | 0,06 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,02 | 0,05 \pm 0,02 | 0,07 \pm 0,01 | 0,09 \pm 0,02 | 0,02 \pm 0,01 |
| 10 dias | 0,69 \pm 0,40 | 0,14 \pm 0,04 | 0,72 \pm 0,37 | 0,70 \pm 0,40 | 0,79 \pm 0,38 | 0,57 \pm 0,22 |
| 14 dias | 0,62 \pm 0,27 | 0,27 \pm 0,20 | 0,66 \pm 0,29 | 0,75 \pm 0,25 | 0,68 \pm 0,34 | 0,39 \pm 0,15 |

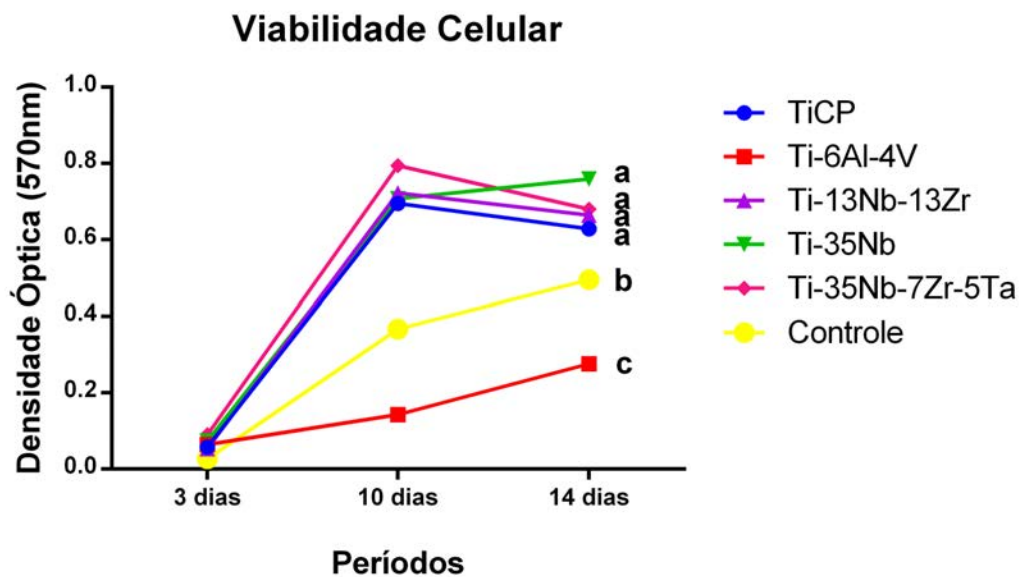


Figura 25 - Gráfico representativo da viabilidade celular e osteoblastos em densidade óptica (570 nm) de cada liga nos vários períodos. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

De acordo com a estatística descritiva, as ligas apresentaram médias próximas aos 3 dias de cultura celular, sendo que a maior delas foi a demonstrada pela liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta, fato que se repetiu aos 10 dias de cultura. No período de 14 dias, no entanto, as únicas ligas que mantiveram suas médias crescentes foram Ti-6Al-4V e Ti-35Nb, sendo que esta última constituiu a maior média do período. Mesmo decaindo aos 14 dias, as ligas Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb-7Zr-5Ta e o TiCP apresentaram médias superiores ao controle e à liga Ti-6Al-4V.

Visando avaliar a influência das ligas de Ti e do tempo de cultura na viabilidade celular, foi aplicado o teste estatístico ANOVA dois fatores, representado na tabela 9. A partir destes resultados, concluiu-se que as ligas, o tempo de cultura e a interação

entre esses fatores apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p = 0,000$ em todas as comparações estatísticas).

Tabela 9 - Teste ANOVA dois fatores para os dados de viabilidade celular, tendo como variáveis a liga de Ti e o tempo de cultura celular

| | Grau de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F | p |
|-----------|-------------------|--------------------|----------------|--------|--------|
| Grupo | 5 | 7,5781 | 1,5156 | 26 | 0,000* |
| Período | 2 | 25,647 | 12,8209 | 219,94 | 0,000* |
| Interação | 10 | 4,0602 | 0,406 | 6,97 | 0,000* |
| Erro | 414 | 24,1332 | 0,0583 | | |
| Total | 431 | 61,4131 | | | |

*diferença estatisticamente significativa

A comparação múltipla pelo teste de Tukey permitiu a observação de três grupos homogêneos de acordo com a liga, sendo que a liga Ti-6Al-4V exibiu a menor média, como pode ser verificado na tabela 10:

Tabela 10 - Teste de Tukey para os dados de viabilidade celular, fixando-se a composição da liga

| Grupo | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|--------|-------------------|
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 0,5215 | A |
| Ti-35Nb | 0,5136 | A |
| Ti-13Nb-13Zr | 0,4805 | A |
| TiCP | 0,4609 | A |
| Controle | 0,2963 | B |
| Ti-6Al-4V | 0,1616 | C |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

Também foi verificada diferença estatística significativa quanto ao tempo de cultura celular. O Teste de Tukey revelou a formação de dois grupos homogêneos, e o com médias mais elevadas foi composto pelos períodos de 10 e 14 dias (Tabela 11).

Tabela 11 - Teste de Tukey para os dados de viabilidade celular, fixando-se o período de cultura celular

| Período | Média | Grupos Homogêneos |
|---------|--------|-------------------|
| 14 | 0,5841 | A |
| 10 | 0,5718 | A |
| 3 | 0,0613 | B |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

O resultado do teste de Tukey para a interação entre liga e tempo de cultura demonstrou que as ligas Ti-35Nb-7Zr-5Ta aos 10 dias e Ti-35Nb aos 14 dias de cultura apresentaram as maiores médias desta comparação, constituindo o grupo homogêneo que diferiu estatisticamente de outra liga nos mesmos períodos de cultura: a liga Ti-6Al-4V aos 10 e 14 dias. O grupo homogêneo com as menores médias foi composto por todas as ligas e o poço controle aos 3 dias de cultura celular (Tabela 12).

Tabela 12 - Teste de Tukey para os dados da interação entre liga e períodos de cultura celular para a viabilidade celular

| Grupo | Período | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|---------|--------|-------------------|
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 10 | 0,0794 | A |
| Ti-35Nb | 14 | 0,7593 | A |
| Ti-13Nb-13Zr | 10 | 0,7229 | AB |
| Ti-35Nb | 10 | 0,7080 | AB |
| TiCP | 10 | 0,6954 | AB |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 14 | 0,6800 | AB |
| Ti-13Nb-13Zr | 14 | 0,6648 | AB |
| TiCP | 14 | 0,6291 | AB |
| Controle | 14 | 0,4950 | BC |
| Controle | 10 | 0,3670 | CD |
| Ti-6Al-4V | 14 | 0,2766 | CDE |
| Ti-6Al-4V | 10 | 0,1433 | DEF |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 3 | 0,0902 | EF |
| Ti-35Nb | 3 | 0,0736 | EF |
| Ti-6Al-4V | 3 | 0,0649 | EF |
| TiCP | 3 | 0,0581 | EF |
| Ti-13Nb-13Zr | 3 | 0,0538 | EF |
| Controle | 3 | 0,0270 | F |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

5.5 Conteúdo de Proteína Total

A influência das cinco composições das amostras: TiCP, Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta, sob dois diferentes tempos de cultura (3 e 10 dias) sobre o conteúdo de proteína total constituíram dez condições experimentais a serem

estudadas (5 x 2). A estatística descritiva das mesmas é apresentada na tabela 13 e representada na figura 26 a seguir.

Tabela 13 - Média (\pm desvio padrão) dos dados de conteúdo de proteína total ($\mu\text{g/mL}$) obtidos sob diferentes ligas de Ti e ação do tempo de cultura celular

| Proteína Total | TiCP | Ti-6Al-4V | Ti-13Nb-13Zr | Ti-35Nb | Ti-35Nb-7Zr-5Ta | Controle |
|----------------|------------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 3 dias | 64,8 \pm 50,7 | 67,07 \pm 15,25 | 34,55 \pm 12,06 | 63,9 \pm 38,9 | 84,5 \pm 51,7 | 16,04 \pm 15,16 |
| 10 dias | 157,2 \pm 40,7 | 127,04 \pm 29,13 | 160,9 \pm 43 | 196,5 \pm 48,1 | 209,2 \pm 37,3 | 94,2 \pm 65,2 |

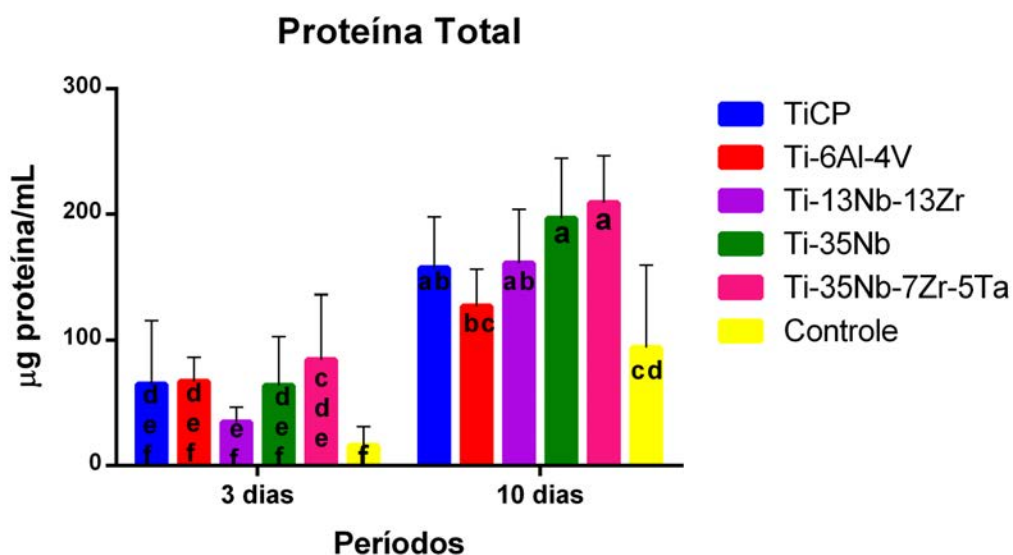


Figura 26 - Gráfico representativo do conteúdo de proteína total em $\mu\text{g/mL}$ de cada liga nos períodos estudados. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

Os resultados da estatística descritiva demonstraram que a liga que apresentou maiores médias de conteúdo de proteína total aos 3 e 10 dias de cultura celular foi a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta. Por outro lado, a menor médias aos 3 dias foi a demonstrada por Ti-13Nb-13Zr, enquanto que aos 10 dias a liga com menor expressão de PT foi Ti-6Al-4V .

A influência das ligas de Ti e do tempo de cultura no conteúdo de proteína total foi avaliada através do teste estatístico ANOVA dois fatores, representado na tabela 14. Estes resultados, demonstraram que as ligas ($p = 0,000$), o tempo de cultura ($p = 0,000$) e estes dois fatores associados ($p = 0,008$) apresentaram diferença estatística significativa nas comparações estatísticas realizadas.

Tabela 14 - Teste ANOVA dois fatores para os dados de proteína total, tendo como variáveis a liga de Ti e o tempo de cultura celular

| | Grau de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F | p |
|-----------|-------------------|--------------------|----------------|--------|--------|
| Grupo | 5 | 120425 | 24085 | 14,59 | 0,000* |
| Período | 1 | 377297 | 377297 | 228,52 | 0,000* |
| Interação | 5 | 26853 | 5371 | 3,25 | 0,008* |
| Erro | 132 | 217937 | 1651 | | |
| Total | 143 | 742512 | | | |

*diferença estatisticamente significativa

A comparação múltipla pelo teste de Tukey exibiu quatro grupos homogêneos de acordo com a liga. A liga de Ti-35Nb-7Zr-5Ta apresentou a maior média, e também diferença estatística

significante entre TiCP, Ti-13Nb-13Zr e Ti-6Al-4V, como pode ser verificado na tabela 15:

Tabela 15 - Teste de Tukey para os dados do conteúdo de proteína total, fixando-se a composição da liga

| Grupo | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|--------|-------------------|
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 146,83 | A |
| Ti-35Nb | 130,26 | AB |
| TiCP | 111,02 | B |
| Ti-13Nb-13Zr | 97,75 | B |
| Ti-6Al-4V | 97,05 | B |
| Controle | 55,1 | C |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

O período de tempo de cultura celular consistiu em mais um evento que apresentou diferença estatística significativa quanto ao conteúdo de proteína total. O Teste de Tukey demonstrou a formação de dois grupos homogêneos, com médias mais elevadas para o período de 10 dias (Tabela 16).

Tabela 16 - Teste de Tukey para os dados de proteína total, fixando-se o período de cultura celular

| Período | Média | Grupos Homogêneos |
|---------|--------|-------------------|
| 10 | 157,52 | A |
| 3 | 55,14 | B |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

A interação entre liga e tempo de cultura estabelecida pelo teste de Tukey demonstrou que o efeito tempo foi decisivo para que as ligas apresentassem maiores médias, pois todas as ligas aos 10 dias de cultura apresentaram médias superiores às médias exibidas aos 3 dias. As ligas Ti-35Nb-7Zr-5Ta e Ti-35Nb aos 10 dias apresentaram as maiores médias, e diferiram estatisticamente de todas as ligas aos 3 dias de cultura, e até mesmo da liga Ti-6Al-4V aos 10 dias (Tabela 17).

Tabela 17 - Teste de Tukey para os dados da interação entre liga e períodos de cultura celular para a proteína total

| Grupo | Período | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|---------|--------|-------------------|
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 10 | 209,17 | A |
| Ti-35Nb | 10 | 196,55 | A |
| Ti-13Nb-13Zr | 10 | 160,95 | AB |
| TiCP | 10 | 157,24 | AB |
| Ti-6Al-4V | 10 | 127,04 | BC |
| Controle | 10 | 94,16 | CD |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 3 | 84,5 | CDE |
| Ti-6Al-4V | 3 | 67,07 | DEF |
| TiCP | 3 | 64,8 | DEF |
| Ti-35Nb | 3 | 63,91 | DEF |
| Ti-13Nb-13Zr | 3 | 34,55 | EF |
| Controle | 3 | 16,04 | F |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

5.6 Atividade da fosfatase alcalina

A influência das ligas de Ti: TiCP, Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta, sob dois diferentes tempos de cultura (3 e 10 dias) sobre a atividade da fosfatase alcalina constituíram dez condições experimentais a serem estudadas (5 x 2). A estatística descritiva das mesmas é apresentada na tabela 18 e representada na figura 27 a seguir.

Tabela 18 - Média (\pm desvio padrão) dos dados da atividade da fosfatase alcalina (μmol timolftaleína/h/mg proteína) obtidos sob diferentes ligas de Ti e ação do tempo de cultura celular

| Fosfatase Alcalina | TiCP | Ti-6Al-4V | Ti-13Nb-13Zr | Ti-35Nb | Ti-35Nb-7Zr-5Ta | Controle |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| 3 dias | 1,03 \pm 0,20 | 1,28 \pm 0,17 | 0,93 \pm 0,27 | 0,90 \pm 0,24 | 0,99 \pm 0,22 | 1,04 \pm 0,2 |
| 10 dias | 0,39 \pm 0,20 | 0,77 \pm 0,49 | 0,73 \pm 0,41 | 0,46 \pm 0,28 | 0,54 \pm 0,34 | 0,58 \pm 0,4 |

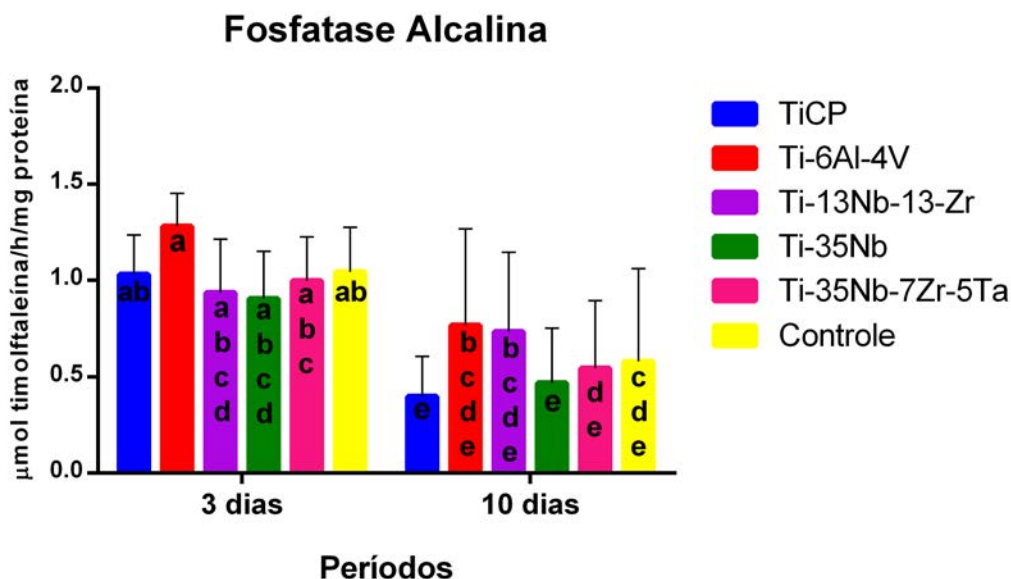


Figura 27 - Gráfico representativo da atividade da fosfatase alcalina em $\mu\text{mol timolftaleína/h/mg proteína}$ de cada liga nos períodos estudados. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

A estatística descritiva demonstrou que a liga que apresentou a maior média de atividade da fosfatase alcalina aos 3 e 10 dias de cultura celular foi a liga Ti-6Al-4V. Já as menores médias foram observadas para o Ti-35Nb e TiCP, aos 3 e 10 dias respectivamente.

A tabela 19 apresenta os resultados do teste estatístico ANOVA dois fatores quando se analisou a influência das ligas de Ti e do tempo de cultura na atividade da fosfatase alcalina. Os resultados demonstraram que as ligas ($p = 0,000$) e o tempo de cultura ($p = 0,000$) apresentaram diferença estatística significativa, enquanto que a interação entre esses dois eventos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,319$).

Tabela 19 - Teste ANOVA dois fatores para os dados de atividade da fosfatase alcalina, tendo como variáveis a liga de Ti e o tempo de cultura celular

| | Grau de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F | p |
|-----------|-------------------|--------------------|----------------|-------|--------|
| Grupo | 1 | 7,254 | 7,254 | 72,05 | 0,000* |
| Período | 5 | 1,7472 | 0,3494 | 3,47 | 0,000* |
| Interação | 5 | 0,5971 | 0,1194 | 1,19 | 0,319 |
| Erro | 132 | 13,2897 | 0,1006 | | |
| Total | 143 | 22,8879 | | | |

*diferença estatisticamente significativa

Os resultados obtidos pelo teste de Tukey demonstraram diferença estatística significativa da liga Ti-6Al-4V, com a maior média, quanto às ligas Ti-35Nb e TiCP (Tabela 20).

Tabela 20 - Teste de Tukey para os dados da atividade da fosfatase alcalina, fixando-se a composição da liga

| Grupo | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|--------|-------------------|
| Ti-6Al-4V | 1,0255 | A |
| Ti-13Nb-13Zr | 0,8360 | AB |
| Controle | 0,8125 | AB |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 0,7715 | AB |
| TiCP | 0,7150 | B |
| Ti-35Nb | 0,6867 | B |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

O tempo de cultura celular também exibiu diferença estatística significativa quanto à atividade da fosfatase alcalina. A

maior média foi observada aos 3 dias de cultura, como apresentado na tabela 21 pelo teste de Tukey.

Tabela 21 - Teste de Tukey para os dados atividade da fosfatase alcalina, fixando-se o período de cultura celular

| Período | Média | Grupos Homogêneos |
|---------|--------|-------------------|
| 3 | 1,0323 | A |
| 10 | 0,5834 | B |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

5.7 Produção citocinas TNF- α e IL-6 e fator de crescimento TGF- β 1

5.7.1 Produção de TNF- α

A influência da composição das ligas de Ti: Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta e TiCP, sob dois diferentes tempos de cultura (7 e 14 dias) sobre a produção de TNF- α constituiu dez condições experimentais a serem estudadas (5 x 2). A estatística descritiva das mesmas é apresentada na tabela 22 e representada na figura 28 a seguir.

Tabela 22 - Média (\pm desvio padrão) dos dados da produção de TNF- α (pg/mL) obtidos sobre diferentes ligas de Ti e ação do tempo de cultura celular

| Produção de TNF- α | TiCP | Ti-6Al-4V | Ti-13Nb-13Zr | Ti-35Nb | Ti-35Nb-7Zr-5Ta | Controle |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| 7 dias | 22,1 \pm 11,5 | 49,8 \pm 23,5 | 58 \pm 24,3 | 84,3 \pm 24,4 | 101,7 \pm 33,6 | 0 \pm 0 |
| 14 dias | 30,3 \pm 19,6 | 75,4 \pm 23,9 | 66,4 \pm 16,1 | 69,1 \pm 20,6 | 83,3 \pm 24,3 | 0,4 \pm 0,38 |

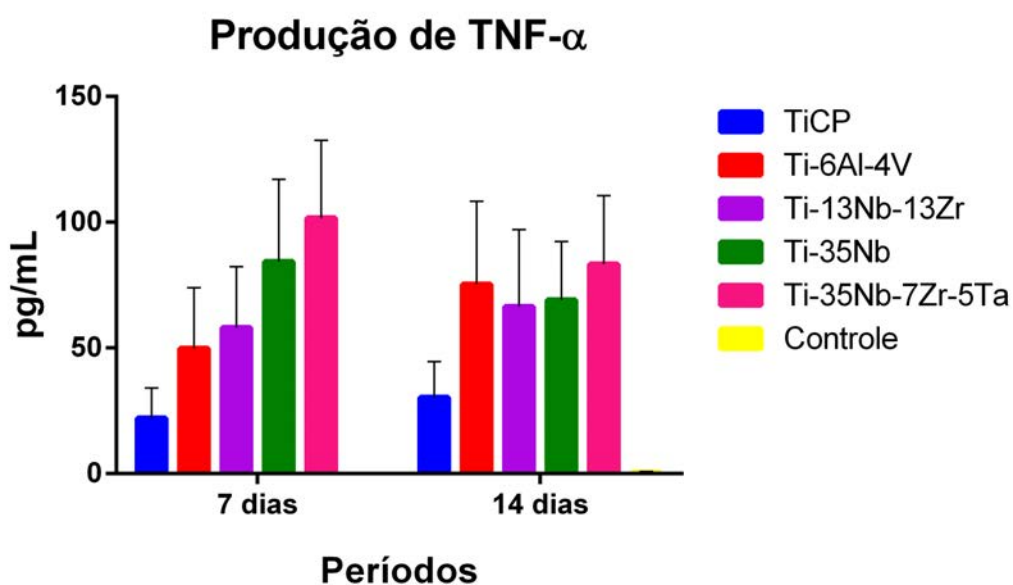


Figura 28 - Gráfico representativo da produção de TNF- α , em pg/mL, de cada liga nos períodos estudados.

A estatística descritiva demonstrou que a liga que apresentou a maior média de produção de TNF- α aos 7 e 14 dias de cultura celular foi a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta. Já as menores médias foram observadas para o TiCP em ambos os períodos.

Quando se analisou a influência das ligas de Ti e do tempo de cultura sobre a produção de TNF- α os resultados do teste

estatístico ANOVA dois fatores demonstraram que as ligas ($p = 0,002$) apresentaram diferença estatística significativa, enquanto que o tempo de cultura ($p = 0,915$) e a interação entre os dois eventos ($p = 0,946$) não constituíram diferença estatística (Tabela 23).

Tabela 23 - Teste ANOVA dois fatores para os dados de produção de TNF- α , tendo como variáveis a liga de Ti e o tempo de cultura celular

| | Grau de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F | p |
|-----------|-------------------|--------------------|----------------|------|--------|
| Grupo | 5 | 139364 | 27872,900 | 4,07 | 0,002* |
| Período | 1 | 79 | 79,200 | 0,01 | 0,915 |
| Interação | 5 | 8082 | 1616,300 | 0,24 | 0,946 |
| Erro | 132 | 903492 | 6844,600 | | |
| Total | 143 | 1051018 | | | |

*diferença estatisticamente significativa

Os resultados obtidos pelo teste de Tukey demonstraram que todas as ligas estudadas foram semelhantes estatisticamente, sendo que a diferença estatística ocorreu entre as ligas com as maiores médias Ti 35Nb-7Zr-5Ta e Ti-35Nb e o poço controle (Tabela 24).

Tabela 24 - Teste de Tukey para os dados da de produção de TNF- α , fixando-se a composição da liga

| Grupo | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|--------|-------------------|
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 92,527 | A |
| Ti-35Nb | 76,667 | A |
| Ti-6Al-4V | 62,607 | AB |
| Ti-13Nb-13Zr | 62,226 | AB |
| TiCP | 26,167 | AB |
| Controle | 0,199 | B |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

5.7.2 Produção de IL-6

A influência da composição das ligas de Ti: Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta e TiCP, sob dois diferentes tempos de cultura (7 e 14 dias) sobre a produção de IL-6 constituiu dez condições experimentais a serem estudadas (5 x 2). A estatística descritiva das mesmas é apresentada na tabela 25 e representada na figura 29 a seguir.

Tabela 25 - Média (\pm desvio padrão) dos dados da produção de IL-6 (pg/mL) obtidos sobre diferentes ligas de Ti e ação do tempo de cultura celular

| Produção de IL-6 | TiCP | Ti-6Al-4V | Ti-13Nb-13Zr | Ti-35Nb | Ti-35Nb-7Zr-5Ta | Controle |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| 7 dias | 498 \pm 693 | 103,9 \pm 100 | 452 \pm 582 | 918 \pm 823 | 426 \pm 369 | 759 \pm 946 |
| 14 dias | 4863 \pm 2435 | 3184 \pm 2985 | 5340 \pm 2293 | 5705 \pm 1903 | 5032 \pm 2888 | 574 \pm 633 |

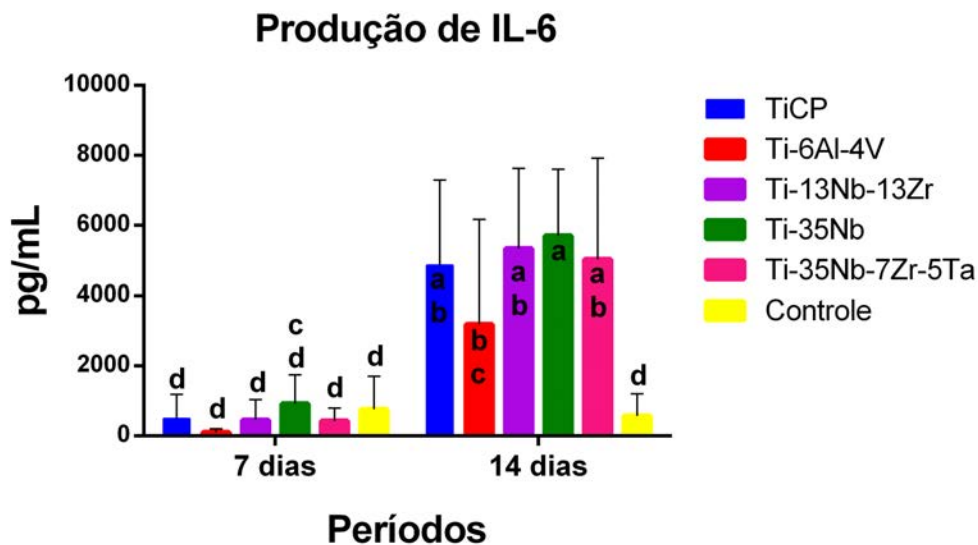


Figura 29 - Gráfico representativo da produção de IL-6, em pg/mL, de cada liga nos períodos estudados. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

A partir dos dados obtidos através da estatística descritiva, pôde-se verificar que a liga Ti-6Al-4V apresentou a maior média aos 7 dias, enquanto que o TiCP apresentou a menor média neste período. Aos 14 dias de cultura celular, no entanto, a liga com maior média de produção de IL-6 foi a liga Ti-35Nb, e a menor média foi exibida mais uma vez pelo TiCP.

Quando se analisou a influência das ligas de Ti e do tempo de cultura sobre a produção de IL-6, os resultados do teste estatístico ANOVA dois fatores demonstraram que as ligas, o tempo de cultura e a interação entre os dois eventos ($p = 0,000$ em todas as comparações) apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 26).

Tabela 26 - Teste ANOVA dois fatores para os dados de produção de IL-6, tendo como variáveis a liga de Ti e o tempo de cultura celular.

| | Grau de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F | p |
|-----------|-------------------|--------------------|----------------|--------|--------|
| Grupo | 5 | 115280115 | 23056023 | 7,91 | 0,000* |
| Período | 1 | 464040785 | 464040785 | 159,11 | 0,000* |
| Interação | 5 | 115526338 | 23105268 | 7,92 | 0,000* |
| Erro | 132 | 384986643 | 2916565 | | |
| Total | 143 | 1079833882 | | | |

*diferença estatisticamente significante

Comparando-se os grupos através do teste de Tukey, quanto à produção de IL-6 também verificou-se que as ligas propostas foram semelhantes estatisticamente, sendo que Ti-35Nb e Ti-13Nb-13Zr demonstraram as maiores médias. A diferença estatística ocorreu entre estas duas ligas e o controle poliestireno, com a menor média (Tabela 27).

Tabela 27 - Teste de Tukey para os dados da produção de IL-6, fixando-se a composição da liga

| Grupo | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|-------|-------------------|
| Ti-35Nb | 3312 | A |
| Ti-13Nb-13Zr | 2896 | A |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 2729 | AB |
| TiCP | 2681 | AB |
| Ti-6Al-4V | 1644 | AB |
| Controle | 666 | B |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

O tempo de cultura celular também exibiu diferença estatística significativa quanto à produção de IL-6. A maior média foi observada aos 7 dias de cultura, como apresentado na tabela 28 pelo teste de Tukey.

Tabela 28 - Teste de Tukey para os dados atividade da produção de IL-6, fixando-se o período de cultura celular

| Período | Média | Grupos Homogêneos |
|---------|-------|-------------------|
| 14 | 4116 | A |
| 7 | 526 | B |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

A interação entre as ligas estudadas e tempo de cultura estabelecida pelo teste de Tukey demonstrou que a liga Ti-35Nb aos 14 dias de cultura celular representou a maior média, diferindo estatisticamente da liga Ti-6Al-4V e do poço controle neste período. Aos 7 dias de cultura, também a maior média foi exibida pela liga Ti-35Nb, porém sem diferença estatística (Tabela 29).

Tabela 29 - Teste de Tukey para os dados da interação entre liga e períodos de cultura celular para a produção de IL-6

| Grupo | Período | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|---------|--------|-------------------|
| Ti-35Nb | 14 | 5705,4 | A |
| Ti-13Nb-13Zr | 14 | 5339,5 | AB |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 14 | 5031,8 | AB |
| TiCP | 14 | 4863 | AB |
| Ti-6Al-4V | 14 | 3184,3 | BC |
| Ti-35Nb | 7 | 918,5 | CD |
| Controle | 7 | 758,6 | D |
| Controle | 14 | 574,3 | D |
| TiCP | 7 | 498,2 | D |
| Ti-13Nb-13Zr | 7 | 451,7 | D |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 7 | 425,8 | D |
| Ti-6Al-4V | 7 | 103,9 | D |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

5.7.6 Produção de TGF- β 1

A influência da composição das ligas de Ti: Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta e TiCP, sob dois diferentes tempos de cultura (7 e 14 dias) sobre a produção de TGF- β 1 constituiu dez condições experimentais a serem estudadas (5 x 2). A estatística descritiva das mesmas é apresentada na tabela 30 e representada na figura 30 a seguir.

Tabela 30 - Média (\pm desvio padrão) dos dados da produção de TGF- β 1 (pg/mL) obtidos sobre diferentes ligas de Ti e ação do tempo de cultura celular

| TGF - β 1 | TiCP | Ti-6Al-4V | Ti-13Nb-13Zr | Ti-35Nb | Ti-35Nb-7Zr-5Ta | Controle |
|-----------------|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 7 dias | 781,42 \pm 96,75 | 696,38 \pm 145,46 | 762,48 \pm 82,94 | 763,6 \pm 137,5 | 779,8 \pm 59,9 | 792,58 \pm 25,3 |
| 14 dias | 1258,9 \pm 142,4 | 1054,22 \pm 166,75 | 1136 \pm 222,48 | 1264,06 \pm 139,3 | 1438,5 \pm 145,83 | 1378,32 \pm 197,22 |

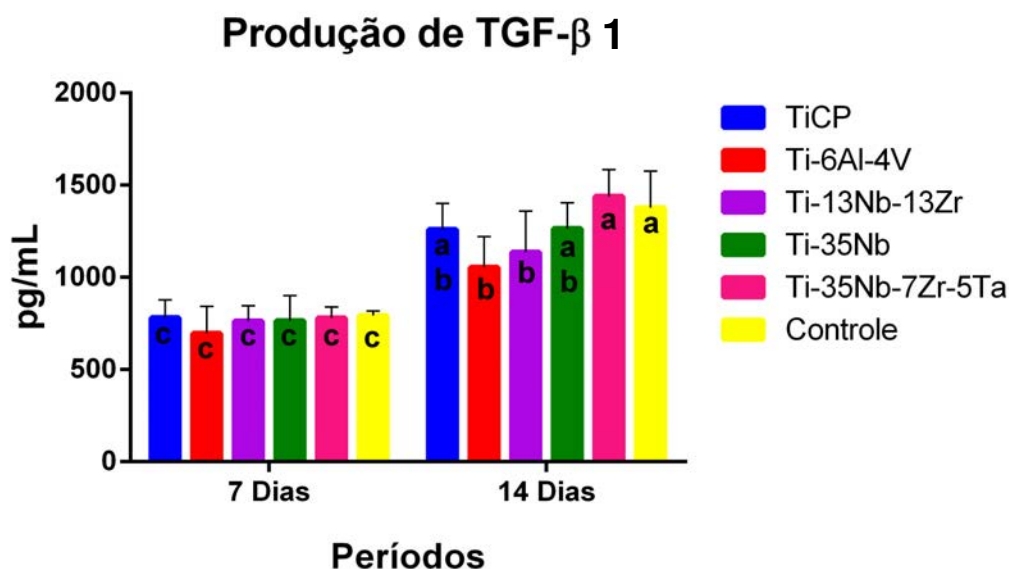


Figura 30 - Gráfico representativo da produção de TGF- β 1, em pg/mL, de cada liga nos períodos estudados. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

Os dados obtidos através da estatística descritiva demonstraram que a maior média aos 7 dias foi apresentada pelo poço controle, porém entre as ligas a média exibida pelo TiCP foi a mais alta. Neste período, a menor média foi apresentada pela liga Ti-6Al-4V. Aos 14 dias de cultura celular, no entanto, a liga com maior média de produção de TGF- β 1 foi a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta, e a menor média foi exibida mais uma vez pela liga Ti-6Al-4V.

Quando se analisou a influência das ligas de Ti e do tempo de cultura sobre a produção de TGF- β 1, os resultados do teste estatístico ANOVA dois fatores demonstraram que as ligas ($p = 0,0001$), o tempo de cultura ($p = 0,000$) e a interação entre os dois eventos ($p = 0,022$) apresentaram diferença estatística significativa (Tabela 31).

Tabela 31 - Teste ANOVA dois fatores para os dados de produção de TGF- β 1, tendo como variáveis a liga de Ti e o tempo de cultura celular

| | Grau de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F | p |
|-----------|-------------------|--------------------|----------------|--------|---------|
| Grupo | 5 | 599519 | 119904 | 6,05 | 0,0001* |
| Período | 1 | 5816245 | 5816245 | 293,64 | 0,0000* |
| Interação | 5 | 275615 | 55123 | 2,78 | 0,0224* |
| Erro | 84 | 1663800 | 19807 | | |
| Total | 95 | 8355179 | | | |

*diferença estatisticamente significante

Quanto às ligas propostas, o teste de Tukey verificou que houve diferença estatística entre a liga com a maior média, Ti-35Nb-7Zr-5Ta e as duas menores, as ligas Ti-13Nb-13Zr e Ti-6Al-4V, com a menor média (Tabela 32).

Tabela 32 - Teste de Tukey para os dados da produção de TGF- β 1, fixando-se a composição da liga

| Grupo | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|--------|-------------------|
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 1109,1 | A |
| Controle | 1085,5 | AB |
| TiCP | 1020,2 | ABC |
| Ti-35Nb | 1013,8 | ABC |
| Ti-13Nb-13Zr | 949,2 | BC |
| Ti-6Al-4V | 875,3 | C |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

O tempo de cultura celular também exibiu diferença estatística significativa quanto à produção de TGF- β 1. A maior média foi observada aos 14 dias de cultura, como apresentado na tabela 33 pelo teste de Tukey.

Tabela 33 - Teste de Tukey para os dados atividade da produção de TGF- β 1, fixando-se o período de cultura celular

| Período | Média | Grupos Homogêneos |
|---------|-------|-------------------|
| 14 | 1255 | A |
| 7 | 762,7 | B |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

A interação entre liga e tempo de cultura estabelecida pelo teste de Tukey demonstrou que o período de cultura foi fundamental para que as ligas apresentassem maiores médias, pois

todas as ligas aos 14 dias de cultura apresentaram médias superiores às médias exibidas aos 7 dias. As ligas Ti-35Nb-7Zr-5Ta e o poço controle aos 14 dias apresentaram as maiores médias, e diferiram estatisticamente de todas as ligas aos 7 dias de cultura, e até mesmo das ligas Ti-13Nb-13Zr e Ti-6Al-4V aos 14 dias (Tabela 34).

Tabela 34 - Teste de Tukey para os dados da interação entre liga e períodos de cultura celular para a produção de TGF- β 1

| Grupo | Período | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|---------|--------|-------------------|
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 14 | 1438,5 | A |
| Controle | 14 | 1378,3 | A |
| Ti-35Nb | 14 | 1264,1 | AB |
| TiCP | 14 | 1258,9 | AB |
| Ti-13Nb-13Zr | 14 | 1136 | B |
| Ti-6Al-4V | 14 | 1054,2 | B |
| Controle | 7 | 792,6 | C |
| TiCP | 7 | 781,4 | C |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 7 | 779,8 | C |
| Ti-35Nb | 7 | 763,6 | C |
| Ti-13Nb-13Zr | 7 | 762,5 | C |
| Ti-6Al-4V | 7 | 696,4 | C |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

5.8 Formação e quantificação dos nódulos de mineralização

A influência da composição das ligas de Ti: Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta e TiCP, sob dois diferentes tempos de cultura (14 e 21 dias) sobre a formação e quantificação dos nódulos de mineralização constituíram dez

condições experimentais a serem estudadas (5 x 2). A estatística descritiva das mesmas é apresentada na tabela 35 e representada na figura 31 a seguir.

Tabela 35 - Média (\pm desvio padrão) dos dados da atividade da formação e quantificação dos nódulos de mineralização (densidade óptica – 405 nm) obtidos sob diferentes ligas de Ti e ação do tempo de cultura celular

| Nódulos de Mineralização | TiCP | Ti-6Al-4V | Ti-13Nb-13Zr | Ti-35Nb | Ti-35Nb-7Zr-5Ta | Controle |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 14 dias | 0,41 \pm 0,15 | 0,59 \pm 0,24 | 0,24 \pm 0,06 | 0,74 \pm 0,29 | 0,86 \pm 0,15 | 0,02 \pm 0,01 |
| 21 dias | 0,34 \pm 0,15 | 0,50 \pm 0,15 | 0,18 \pm 0,05 | 0,49 \pm 0,12 | 0,51 \pm 0,11 | 0,13 \pm 0,18 |

Formação de Nódulos de Mineralização

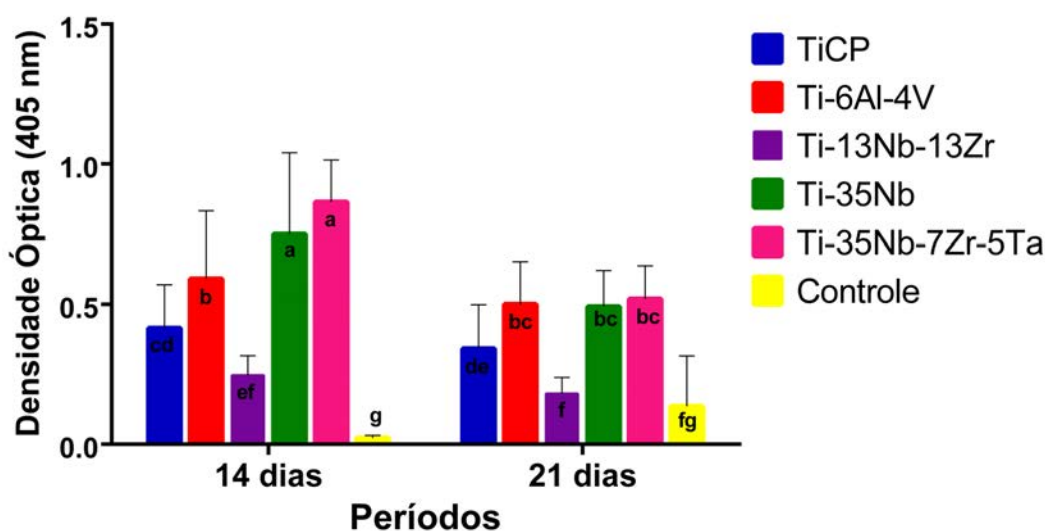


Figura 31 - Gráfico representativo da formação de matriz mineralizada em densidade óptica (405 nm) de cada liga nos períodos estudados. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

Os dados obtidos a partir da estatística descritiva demonstraram que a liga que apresentou a maior média da formação de nódulos de mineralização aos 14 e 21 dias de cultura celular foi a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta. As menores médias, no entanto, foram exibidas pela liga Ti-13Nb-13Zr, também para ambos os períodos.

Ao estabelecer a comparação pelo teste ANOVA dois fatores, constatou-se que a influência da composição das ligas de Ti, o tempo de cultura e a interação entre estes dois fatores resultaram em diferença estatística significativa ($p = 0,000$ em todas as comparações) na formação de nódulos de mineralização (Tabela 36).

Tabela 36 - Teste ANOVA dois fatores para os dados de formação de nódulos de mineralização, tendo como variáveis a liga de Ti e o tempo de cultura celular

| | Grau de Liberdade | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | F | p |
|-----------|-------------------|--------------------|----------------|--------|--------|
| Grupo | 5 | 20,9141 | 4,1828 | 163,11 | 0,000* |
| Período | 1 | 1,5494 | 1,5494 | 60,42 | 0,000* |
| Interação | 5 | 2,3416 | 0,4683 | 18,26 | 0,000* |
| Erro | 420 | 10,7708 | 0,0256 | | |
| Total | 431 | 35,5759 | | | |

*diferença estatisticamente significativa

Quando se fixou o fator composição da liga, a comparação múltipla pelo teste de Tukey revelou seis grupos homogêneos distintos, sendo que a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta representou a maior média e somente não exibiu diferença estatística da liga Ti-35Nb, como pode ser verificado na tabela 37:

Tabela 37 - Teste de Tukey para os dados de formação de nódulos de mineralização, fixando-se a composição da liga

| Grupo | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|--------|-------------------|
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 0,6918 | A |
| Ti-35Nb | 0,6210 | AB |
| Ti-6Al-4V | 0,5458 | B |
| TiCP | 0,3784 | C |
| Ti-13Nb-13Zr | 0,2140 | D |
| Controle | 0,0791 | E |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

O Teste de Tukey para o fator período de tempo de cultura celular verificou a formação de dois grupos homogêneos, sendo que o período de 14 dias foi o período que apresentou a maior média de formação de nódulos de mineralização (Tabela 38).

Tabela 38 - Teste de Tukey para os dados de formação de nódulos de mineralização, fixando-se o período de cultura celular

| Período | Média | Grupos Homogêneos |
|---------|--------|-------------------|
| 14 | 0,4816 | A |
| 21 | 0,3618 | B |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

O teste de Tukey realizado para os dados da associação dos fatores liga e tempo de cultura verificou que Ti-35Nb-7Zr-5Ta e Ti-35Nb aos 14 dias de cultura celular apresentaram as maiores médias e diferiram estatisticamente das demais ligas nos períodos avaliados. Em contrapartida, a liga Ti-13Nb-13Zr apresentou as

menores médias de formação de nódulos de mineralização tanto no período de 14 quanto no período de 21 dias (Tabela 39).

Tabela 39 - Teste de Tukey para os dados da interação entre liga e períodos de cultura celular para a formação de nódulos de mineralização

| Grupo | Período | Média | Grupos Homogêneos |
|-----------------|---------|--------|-------------------|
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 14 | 0,8642 | A |
| Ti-35Nb | 14 | 0,7499 | A |
| Ti-6Al-4V | 14 | 0,5912 | B |
| Ti-35Nb-7Zr-5Ta | 21 | 0,5195 | BC |
| Ti-6Al-4V | 21 | 0,5004 | BC |
| Ti-35Nb | 21 | 0,4921 | BC |
| TiCP | 14 | 0,4153 | CD |
| TiCP | 21 | 0,3416 | DE |
| Ti-13Nb-13Zr | 14 | 0,2469 | EF |
| Ti-13Nb-13Zr | 21 | 0,1812 | F |
| Controle | 21 | 0,136 | FG |
| Controle | 14 | 0,0222 | G |

médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

6 DISCUSSÃO

Cerca de 70 a 80% dos implantes biomédicos são feitos de biomateriais metálicos, e esta demanda tem aumentado ano a ano, devido ao aumento da expectativa de vida da população. Mesmo com estes números crescentes, as propriedades biológicas e mecânicas dos biomateriais metálicos não são adequadas e necessitam de aperfeiçoamentos (Niinomi et al., 2012). Neste sentido, o desenvolvimento de um material que reúna a composição química que estimule resposta favorável do organismo aliado a uma morfologia que facilite e diminua o tempo de osseointegração tem sido o objetivo das pesquisas na área de implantes biomédicos e biomateriais.

Neste estudo foi avaliado o comportamento de células osteogênicas em contato com amostras porosas de TiCP e das ligas Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta, através de testes de citotoxicidade, produção de citocinas e a imunolocalização de proteínas osteogênicas. Os resultados mostraram que estas ligas foram biocompatíveis e na maioria dos testes superaram as ligas já conhecidas e utilizadas para implantes biomédicos, como a liga Ti-6Al-4V e o TiCP. Além disso, pôde-se constatar que com exceção da formação de nódulos de mineralização, os períodos mais longos de cultura propiciaram médias mais elevadas para todas as ligas e o TiCP.

Durante os últimos 40 anos o titânio vem sendo considerado o biomaterial padrão ouro para a confecção de próteses e implantes odontológicos e ortopédicos, principalmente por apresentar

boas propriedades biológicas e mecânicas. Hoje, para alguns autores, estas propriedades são consideradas apenas satisfatórias (Niinomi et al., 2012). Elevada relação resistência/massa específica, baixo peso específico ($4,51\text{g/cm}^3$), elevada resistência à corrosão, excelente biocompatibilidade e a possibilidade de ser tanto fundido quanto processado por metalurgia do pó são algumas das propriedades que fazem do Ti o material de escolha para confecção de implantes biomédicos (Schneider, 2001). No entanto, ao longo de anos de utilização e emprego nas áreas médica e odontológica, surgiram inconvenientes na utilização deste material, que atualmente fazem com que haja dúvida sobre a sua eficiência sob certas condições. Na prática clínica, a principal desvantagem, e alvo de pesquisas é a diferença entre o módulo de elasticidade do implante e do osso (110 GPa e 10-35 GPa, respectivamente). No sentido de minimizar este problema, foram propostas modificações na estrutura do implante, como confecção de porosidades e adição de metais ao Ti, dando origem às ligas de Ti (Laheurte et al., 2010).

Algumas ligas de Ti foram propostas e com estudos aprofundados foi constatado que certos elementos causavam malefícios ao organismo, como foi o caso do níquel, ligado a reações alérgicas e rejeições, e mais tarde, do vanádio e alumínio, relacionados com o surgimento de desordens neurológicas (Niinomi et al., 2012). Mesmo com contra-indicações, a liga Ti-6Al-4V foi difundida e é utilizada amplamente como implante biomédico, embora as pesquisas estejam demonstrando elementos alternativos para a

composição das ligas de Ti e que a substituição dos elementos tóxicos é viável.

A incorporação de novos elementos de liga ao Ti visa basicamente à manutenção da fase α (em temperatura ambiente, com estrutura cristalina hexagonal compacta – hcp) ou β (a 882 °C, com estrutura cúbica de corpo centrado – ccc). As ligas de Ti podem ser classificadas em α , $\alpha + \beta$ e β , dependendo da sua composição e processamento térmico. Sabe-se que as propriedades mecânicas estão associadas à microestrutura do material, sendo assim, as ligas Ti- α exibem resistência à corrosão superior, mas sua aplicação como biomaterial é limitada por sua resistência mecânica relativamente baixa. Por outro lado, as ligas Ti- $\alpha + \beta$ possuem valores de resistência mecânica mais altos, e as ligas Ti- β apresentam maior relação resistência/peso, maior densidade e menor valor de módulo elástico. Apesar de possuírem mais vantagens que desvantagens, as pesquisas com ligas Ti- β estão apenas no início, sendo que a liga Ti- $\alpha + \beta$ (Ti-6Al-4V) possui a maior participação no mercado, cerca de 65% (Schneider, 2001).

Os novos projetos visam o desenvolvimento de ligas do Ti tipo β de baixo módulo, compostas por elementos não-tóxicos. A primeira liga deste tipo desenvolvida exclusivamente para uso como biomaterial foi a liga Ti-13Nb-13Zr, seguida da liga Ti-35.5Nb-5.1Ta-7.1Zr (Niinomi et al., 2012). Desde então, novas ligas foram propostas e muitas ainda estão em estudo, visando solucionar os problemas da incompatibilidade do módulo de elasticidade, e outros que surgiram com

a difusão dos implantes biomédicos, como a toxicidade e o alto custo de alguns metais, o que encarece a liga (Niinomi et al., 2012).

O nióbio é, entre os metais considerados inertes, o principal estabilizador da fase β do titânio e quando ligado a este na faixa entre 10 e 20% em porcentagem de peso ou numa faixa alternativa entre 35 e 50%, produz ligas de baixo módulo de elasticidade (abaixo de 85 GPa) (Schneider, 2001).

A liga Ti-Zr foi recentemente introduzida ao campo de implantes odontológicos para ser utilizada em situações clínicas mais desafiadoras, porque apresenta melhores propriedades mecânicas do que o TiCP (Al-Nawas et al., 2012; Barter et al., 2012; Chiapasco et al., 2012).

A liga Ti-13Nb-13Zr apresenta grande potencial para uso como biomaterial, e tem sido alvo de pesquisas, pois é composta por elementos não-citotóxicos e possui módulo elástico baixo, quando comparada à liga Ti-6Al-4V. Além disso, os elementos constituintes desta liga apresentam baixo custo, reunindo características que tornam esta liga extremamente vantajosa, pois aumentaria a vida útil do implante, preservaria o tecido ósseo adjacente e diminuiria o custo do implante ao profissional e ao paciente (Duvaizem et al., 2012; Park et al., 2013; Hoerth et al., 2014).

Outra liga de titânio tipo β que destacou-se na última década, foi a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta. Esta liga, devido aos seus elementos constitutivos, apresenta boas propriedades e potencial para aplicação na área biomédica, pois não exibe toxicidade, possui alta resistência à corrosão, excelente biocompatibilidade e baixo módulo de

elasticidade (Ferrandini et al., 2007; Afonso et al., 2010). A desvantagem desta liga, de acordo com Ning et al. (2010) é a baixa resistência à tração. O Ta é um elemento bastante semelhante ao Ti, e por suas boas propriedades mecânicas e biológicas tornou-se atrativo para a confecção de ligas de Ti. No entanto, este é um metal raro, já que as maiores reservas de Ta estão concentradas no Brasil e Austrália (68% e 31% das reservas mundiais, respectivamente). Desta forma, os estudos com esta liga tornaram-se restritos devido ao alto custo do Ta, sendo que alguns autores têm sugerido a troca ou substituição deste elemento por outros que apresentem maior disponibilidade, facilidade de acesso e menor custo (Niinomi et al., 2012).

A liga Ti-35Nb foi relatada por Xiong et al. (2010) como mais biocompatível e menos citotóxica do que o TiCP e ligas de Ti e níquel. Além disso, apresentam melhores efeitos anti-corrosivos e demonstram superelasticidade, sugerindo que podem ser biomateriais promissores.

Por muitos anos os metais sólidos e suas ligas foram utilizados para a fabricação de implantes, no entanto com a tendência crescente para um carregamento mais rápido e a necessidade de implantes mais curtos para casos em que a quantidade de osso de boa qualidade não é suficiente, há um interesse no desenvolvimento de tecnologias para aumentar a estabilidade inicial e a longo prazo dos implantes cirúrgicos. Uma melhor conjugação entre o implante e o osso circundante pode auxiliar a reduzir o comprimento do implante e a evitar procedimentos de enxerto ósseo, quando a altura óssea é insuficiente (Wazen et al., 2010).

Em virtude disso, alterações na topografia e na rugosidade da superfície estão sendo propostas para influenciar positivamente as respostas teciduais e celulares. O desenvolvimento de superfícies ou recobrimentos porosos visa alcançar módulos de elasticidade semelhantes ao osso (Marin et al., 2010) e promover o imbricamento mecânico desse tecido com o metal, por meio do crescimento ósseo para o interior dos poros, aspecto que resulta em maior fixação do implante ao osso

Muitos trabalhos investigaram a influência da porosidade e do tamanho dos poros no comportamento biológico de osteoblastos (Frosch et al., 2003; Vasconcellos et al., 2008a, 2008b, 2010a; Faria et al., 2010; Wazen et al., 2010, Teixeira et al., 2012; Zhang et al., 2012). Alguns estudos sugerem que os biomateriais porosos devem apresentar poros de tamanhos adequados interconectados, que permitam a formação de um novo sistema vascular para a continuidade do crescimento ósseo rumo ao interior dos poros (Teixeira et al., 2012). A literatura relata que poros com tamanhos de 50 a 400 μm são aceitáveis para permitir a ancoragem biológica, porém, não há um consenso sobre o tamanho dos poros para que haja uma resposta tecidual ideal (Li et al., 2007; Pamula et al., 2008; Sicchieri et al., 2012)

Recentemente, Teixeira et al. (2012) avaliaram a viabilidade e expressão gênica de cultura celular sob influência de três tamanho de poros (62 μm , 130 μm e 312 μm). Verificou-se que houve maior espraiamento celular nas amostras parcial ou completamente porosas, e que as amostras com poros de 62 μm propiciaram maior

expressão do fenótipo osteoblástico, comprovado pela baixa taxa de proliferação celular e maior expressão gênica de marcadores ósseos. Em um estudo *in vitro* e *in vivo*, Goia et al. (2013) verificaram que poros acima de 400 μm de diâmetro não favoreceram o crescimento ósseo em seu interior, no entanto poros com 100 μm permitiram o crescimento de tecido ósseo, porém dificultaram a ação da invasão tecidual no interior do implante. Os melhores resultados de crescimento ósseo foram obtidos entre 100 e 200 μm . No presente estudo, a faixa granulométrica específica de 177 a 250 μm dos grânulos da uréia, permitiu obter o tamanho médio dos poros de 99,53 μm , estando em acordo com a faixa de tamanho de poros propostos por estudos prévios (Ning et al., 2010; Niinomi et al., 2012; Goia et al., 2013). Tal valor mostrou-se adequado para que as células cultivadas proliferassem e apresentassem resultados satisfatórios quanto ao metabolismo e nível de atividade celular, comprovada pelos testes de atividade da fosfatase alcalina, conteúdo de proteína total e formação de nódulos de mineralização.

Outro aspecto importante com referência aos poros é a porcentagem em que estão presentes na amostra. A estrutura porosa deve ser homogênea em toda extensão do material e deve apresentar alta porosidade, visando promover espaço suficiente para a adesão e proliferação dos osteoblastos para a formação de matriz óssea, além do transporte de fluidos corpóreos (Wen et al., 2001). Dabrowski et al., confeccionaram, em 2010, um implante com alto grau de porosidade (75%), caracterizado pela alta permeabilidade, baixo módulo de Young e dureza similar ao osso esponjoso. No entanto, este

tipo de implante poroso apresentou como desvantagem o baixo grau de resistência à corrosão, o que segundo os autores, pode ser solucionado através da aplicação de um tratamento de superfície. Neste estudo, foi realizada a pesagem das amostras antes e depois da remoção da ureia em forno a vácuo, e foi observado que todas elas perderam em média 30 a 45% de massa. A faixa de porosidade verificada para as ligas de Ti e o TiCP foi entre 38 e 46%, sendo que a média foi 42%, concordando com o estudo de Goia et al. (2013). Estes resultados mostraram também a eficiência do método de fabricação das amostras, já que conseguiu-se alcançar a porcentagem de poros idealizada.

A interconexão entre os poros também representa um importante papel na reparação peri-implantar, afetando diretamente a osteocondução (Teixeira et al., 2012). A interconexão entre os poros gera uma rede tridimensional, por onde se espraiam e proliferam os osteoblastos (Zhang et al., 2012). Esta conformação e interconexão em rede foi observada nas amostras de todas as ligas utilizadas neste estudo. A análise das imagens obtidas por MEV revelou a existência da intercomunicação e ligação entre os poros.

Diferentes tecnologias têm sido utilizadas para a obtenção de materiais porosos visando aplicações biomédicas (Marin et al., 2010; Rosa et al., 2014). Contudo, algumas técnicas convencionais não conseguem produzir poros interligados. Estas estruturas complexas interligadas em toda a sua espessura são geralmente produzidas por procedimentos específicos tais como a metalurgia do pó (Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008a,

2008b, 2010; Wazen et al., 2010; Faria et al., 2010; Teixeira et al., 2012; Biesiekierski et al., 2012; Goia et al., 2013). Esta técnica consiste na mistura do pó de Ti com os pós dos demais constituintes da liga, seguida por compactação e sinterização (Chen et al., 2012), e apresenta-se bastante eficaz para a produção de implantes porosos, odontológicos e ortopédicos, uma vez que trabalha com temperaturas baixas e permite o controle da estrutura porosa (Medeiros et al., 2008; Biesiekierski et al., 2012). Adicionalmente, possui outras vantagens em relação às técnicas convencionais, como a economia de matéria prima, a redução de custo na fabricação, redução no número de etapas complementares para a produção das amostras e melhor acabamento superficial (Pilliar, 1998; Santos et al., 2008; Biesiekierski et al., 2012).

A metalurgia do pó é uma técnica que permite a obtenção de materiais porosos, no entanto este processo quando executado da maneira clássica não produz porosidade maior que 40%. Para tanto, alguns materiais como polímeros naturais (amido de milho, amido de batata, albumina, gelatina, alginato, entre outros) ou materiais orgânicos (ureia, carbamida, hidrogenocarbonato de amônio, entre outros), podem ser incorporados ao pó da liga para servir como espaçador e dar origem à estrutura porosa homogênea e com alta porcentagem de poros (60 a 80%) (Bottino et al., 2009; Daborowski et al., 2010; Biesiekierski et al., 2012; Goia et al., 2013). Goia et al., (2013) avaliaram o uso de polímeros naturais (amido de arroz, amido de batata, amido de milho, gelatina e albumina) para confecção de poros em TiCP e na liga Ti-13Nb-13Zr. Os autores obtiveram

materiais com porosidades diferenciadas, boa homogeneidade estrutural, grau de porosidade adequado (entre 40% e 60%) e distribuição e tamanho dos poros conforme o polímero natural formador, sendo que nos testes *in vitro*, as amostras com melhores resultados foram as que apresentaram porosidade homogênea, independente do tamanho médio dos poros. Dabrowski et al. (2010) obtiveram sucesso ao utilizar a metalurgia do pó para confeccionar implantes com porosidade de 75%, e concluíram que esta técnica consiste em uma forma bastante eficiente para a fabricação deste tipo de material, que pode representar o futuro da regeneração óssea e fixação de implantes.

Neste estudo, a técnica utilizada para a confecção dos implantes foi a metalurgia do pó, que se mostrou eficaz para a fabricação das amostras idealizadas, tanto para a composição química, como para a confecção de uma estrutura de poros interligados e com tamanhos satisfatórios. A análise por MEV e EDS apresentada demonstrou que todos os elementos utilizados foram encontrados nas quantidades preconizadas para cada liga de Ti, fator importante para apontar o sucesso e eficiência da técnica de metalurgia do pó, e de todos os procedimentos do protocolo executado. Além disso, o elemento espaçador ureia, utilizado para a confecção da estrutura porosa, demonstrou efetividade para a obtenção de poros interligados com diâmetro e porcentagem propostos. Outro fator positivo da ureia foi não interferir na composição e estrutura química final das amostras, já que toda a quantidade adicionada à liga foi removida com sucesso através do forno a vácuo. Todas as ligas estudadas

apresentaram boa compatibilidade e não exibiram reatividade com a ureia.

Para que um novo material seja utilizado em seres humanos é imprescindível que se conheçam as propriedades e o comportamento que o mesmo causará nas células e tecidos envolvidos. Assim, são necessários estudos *in vitro* que caracterizem biologicamente estes materiais e que sirvam de embasamento para pesquisas *in vivo*.

A cultura celular consiste num sistema confiável para coleta de informações sobre as reações biológicas frente a um possível biomaterial (Oréfice, 2006). Este procedimento já é conhecido e divulgado na Literatura, e tem demonstrado ser uma importante ferramenta para o estudo dos biomateriais, uma vez que os resultados obtidos apresentam consistência e íntima ligação com os fenômenos que ocorrem *in vivo*. Existem muitas maneiras de se executar um estudo *in vitro* utilizando cultura de células, e diversos trabalhos relatam metodologias utilizando, por exemplo, linhagens celulares imortalizadas, células provenientes de carcinomas e culturas primárias (Ning et al., 2010; Xiong et al., 2010; Sista et al., 2011).

No intuito de facilitar o processo de obtenção das células, vários estudos têm sido desenvolvidos utilizando cultura de células indiferenciadas da medula óssea. Um estudo comparativo entre os resultados obtidos a partir de culturas de células osteoblásticas provenientes de células indiferenciadas da medula e de culturas primárias publicado recentemente, demonstrou que as células da medula apresentam respostas diferentes das células primárias. Quando

expostas a algumas citocinas pró-inflamatórias, os osteoblastos advindos da cultura primária produziram óxido nítrico e prostaglandina E2 e apresentaram também diminuição da viabilidade celular e também da formação de nódulos de mineralização logo nos períodos iniciais. Em contraste, a cultura de células obtidas da medula não exibiu este comportamento até o 21º dia de cultura, e não apresentou qualquer mudança quanto à formação de matriz mineralizada. Desta forma, o autor concluiu que embora as células indiferenciadas da medula recebam estímulos para se diferenciarem em osteoblastos e apresentem certas características destas células, há diferenças marcantes entre esses dois tipos de cultura, principalmente no que diz respeito à resposta frente ao estímulo com citocinas (Sidney et al., 2014).

Embora a utilização de culturas de células indiferenciadas vindas da medula seja na atualidade a mais utilizada e estudada, ainda há muitas dúvidas sobre a fidedignidade das respostas que estes experimentos trazem, pois a adição de qualquer estímulo para a diferenciação celular pode interferir em todo o metabolismo da célula e gerar resultados que não condizem com a realidade (Variola et al., 2011). Por este motivo, e por de fato já serem células pré-osteoblásticas as existentes na calvária de ratos neonatos, utilizou-se, neste estudo, culturas primárias destas células. Esta é uma metodologia reconhecida e consagrada, que tem sido utilizada em diversos estudos *in vitro* (Schwartz et al., 2007; Wang et al., 2009; Variola et al., 2011; Pereira et al., 2013; Goia et al., 2013). No entanto, há uma carência de estudos que utilizem este tipo de cultura

celular para a análise da estrutura porosa associada às ligas de Ti propostas, mais um fator que colaborou para a eleição da cultura celular primária para este estudo.

O teste de proliferação celular levou em consideração o número de células vivas em cada grupo após os períodos de 24 horas, 3 e 10 dias. Os resultados deste estudo mostraram que houve proliferação celular sobre as amostras de todas as ligas avaliadas, sendo que quando foi levado em consideração somente o fator tipo de liga, a maior média foi exibida pela liga Ti-13Nb-13Zr, porém sem diferença estatística para as demais. Com relação ao tempo, os períodos de 24 horas e 3 dias foram semelhantes entre si e diferentes estatisticamente do período de 10 dias, que apresentou as maiores médias. Considerando a associação dos fatores período de tempo e tipo de liga, verificou-se que às 24 horas e aos 3 dias de cultura não houve diferença estatística entre as ligas. No entanto, aos 10 dias de cultura celular, com exceção da liga Ti-6Al-4V, todas as ligas foram semelhantes à liga que apresentou a maior média, a Ti-13Nb-13Zr. Este fato, segundo Owen et al. (1990) pode ser explicado devido à existência de uma relação recíproca entre diminuição na proliferação e subsequente indução celular à diferenciação, em cultura de células de calvária de ratos. De acordo com Xavier et al. (2003), é possível que materiais diferentes com biocompatibilidades diferentes não interfiram nos períodos iniciais de proliferação celular, fato também verificado no presente estudo devido à ausência de diferença estatística entre as ligas nos períodos de 24 horas e 3 dias. Em comparação, foi observada maior proliferação celular, com diferença estatística, aos 10 dias, do

que às 24 horas e aos 3 dias, concordando com Deliglianni et al. (2001), que demonstraram que há um aumento tempo-dependente da proliferação celular sobre biomateriais.

Levando em consideração a associação entre tempo e ligas de Ti, a única diferença estatística foi observada aos 10 dias de cultura celular entre as ligas Ti-13Nb-13Zr e Ti-6Al-4V. Esta diferença também foi relatada por Park et al. (2011), sugerindo que a liga Ti-13Nb-13Zr pode consistir num substrato mais favorável à proliferação celular, devido à sua maior hidrofília, a qual melhora a adesão e proliferação celulares, em comparação à liga Ti-6Al-4V. Outra justificativa para o desempenho inferior desta liga frente à liga Ti-13Nb-13Zr pode ser a toxicidade aos íons Al e V, relatada em um estudo realizado com cultura de fibroblastos, e que revelou que os íons vanádio liberados a partir da liga Ti-6Al-4V influenciou negativamente a adesão e proliferação celulares. (Eisenbarth et al., 1996; Thompson, Puleo, 1996)

Em suma, os resultados do teste de proliferação celular demonstram a capacidade de desenvolvimento e proliferação das células sobre as ligas estudadas, concordando com estudos prévios que relatam a ausência de citotoxicidade dos elementos constituintes destas ligas (Xiong et al., 2010; Niinomi et al., 2012; Saulacic et al., 2012; Hoerth et al., 2014).

A viabilidade celular foi determinada a partir do teste colorimétrico MTT nos períodos de 3, 10 e 14 dias. Foi verificado que as médias de viabilidade celular cresceram de acordo com a passagem do tempo, configurando diferença estatisticamente significativa entre o

período mais curto (3 dias) e os dois longos (10 e 14 dias), resultado que também foi obtido por Park et al. (2011). Comparando-se somente os grupos, as ligas Ti-13Nb-3Zr, Ti-35Nb, Ti-35Nb-7Zr-5Ta e o TiCP formaram um grupo homogêneo com médias maiores e diferente estatisticamente do grupo composto apenas pela liga Ti-6Al-4V, com a menor média. Este resultado coincide com o relatado por outros autores, os quais atribuem a baixa viabilidade celular apresentada pelas células cultivadas sobre amostras de Ti-6Al-4V aos possíveis efeitos inibitórios dos elementos alumínio e vanádio às funções osteoblásticas (Thompson, Puelo, 1996; Lincks et al., 1998; Cortizo et al., 2000; Hallab et al., 2002; Park et al., 2011)

Em um estudo *in vivo* com implantes de TiCP, Ti-Zr e Ti-6Al-4V, Saulacic et al. (2012) observaram a presença de células gigantes multinucleadas (CGMN) localizadas na periferia dos implantes da liga Ti-6Al-4V nos períodos após 2, 4 e 8 semanas após a cirurgia de colocação do implante. Diante deste achado, os autores afirmaram que este fato diminuiu e retardou a osseointegração. Alguns autores justificaram a presença de CGMN devido à ocorrência de pequenas partículas livres de metal ou à liberação de íons metálicos, porém Saulacic et al. (2012) não relataram ter encontrado tais partículas na região peri-implantar (Han et al., 1998; Johansson et al., 1998; Bainbridge et al., 2001).

Quando os fatores tempo de cultura celular e tipo de liga de Ti foram associados, a liga Ti-6Al-4V apresentou as menores médias nos períodos de 10 e 14 dias, o que constituiu diferença estatística na comparação com todas as ligas estudadas, sendo que a

liga que demonstrou maior média foi a Ti-35Nb-7Zr-5Ta aos 10 dias de cultura. Aos 3 dias de cultura celular, no entanto, não houve diferença entre as ligas. Este desempenho inferior demonstrado pela liga Ti-6Al-4V nas duas comparações a que foi submetida pode ser atribuído aos fatos da citotoxicidade dos íons Al e V, justificado pelos estudos prévios acima citados e explicados (Thompson, Puelo, 1996; Lincks et al., 1998; Han et al., 1998; Johansson et al., 1998; Cortizo et al., 2000; Bainbridge et al., 2001; Hallab et al., 2002; Park et al., 2011; Saulacic et al., 2012). Tais argumentos podem ser aplicados e justificados por estudos que anteriormente observaram que a citotoxicidade dos íons Al e V aumentam progressivamente com o tempo, o que também foi observado neste estudo (Morais et al., 2007; Saulacic et al., 2012). No entanto, o oposto foi observado por Karahalil et al. (2014), os quais notaram leves diferenças quanto à genotoxicidade das ligas TiCP e Ti-6Al-4V, porém sem diferenças estatísticas entre ambas. Os autores levantaram duas hipóteses: ou os níveis de liberação de íon Al e V são muito baixos para serem detectados ao teste de micronúcleo, ou estas ligas exibem grande resistência à corrosão no ambiente oral.

O conteúdo de proteína total representa a capacidade de síntese das células e pode ser considerado parâmetro importante de avaliação da osteogênese *in vitro* (Beloti, Rosa, 2005). Neste estudo, o teste de conteúdo de proteína total revelou que, em relação ao tipo de liga de Ti, a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta foi a que apresentou a maior média, e diferiu estatisticamente do TiCP e das ligas Ti-13Nb-13Zr e Ti-6Al-4V. Estes resultados confirmaram o preconizado pelo estudo

de Samuel et al. (2010) com cultura de células primárias de rato, o qual comparou por meio de testes de citotoxicidade as ligas Ti-6Al-4V e Ti-35Nb-7Zr-5Ta e o TiCP produzidas por deposição de metais a laser. Os autores concluíram que a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta foi biocompatível, auxiliou tanto na proliferação celular quanto na diferenciação celular e exibiu potencial para diferenciação celular substancialmente melhor do que a liga Ti-6Al-4V, o que indica que a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta é uma grande potencial para o emprego em implantes biomédicos.

Quando se comparou as médias dos períodos de 3 e 10 dias verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre estes dois períodos, sendo que as médias aumentaram proporcionalmente ao tempo de cultura celular. O mesmo foi observado quando a comparação foi feita através da interação dos fatores período de tempo de cultura e liga de Ti. Nesta comparação, as médias de conteúdo de proteína total de todas as ligas foram maiores aos 10 dias de cultura, no entanto só foi observada diferença estatística neste período entre as ligas Ti-35Nb-7Zr-5Ta (sendo esta a maior) e Ti-35Nb, constituintes do grupo homogêneo “a” e Ti-6Al-4V, única constituinte do grupo “bc”. Aos 3 dias de cultura, a maior média foi novamente atribuída à liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta, porém desta vez, todos os grupos foram estatisticamente semelhantes.

Existem muitos estudos atuais envolvendo as ligas de Ti tipo β , classificação na qual se enquadram as duas ligas com maior potencial de conteúdo de proteína total verificado neste estudo: Ti-35Nb-7Zr-5Ta e a liga Ti-35Nb. As propriedades e indicações da liga

35Nb-7Zr-5Ta já foram abordadas e descritas detalhadamente anteriormente, visto que por vezes esta liga tem se apresentado entre as maiores médias dos testes realizados neste estudo. Da mesma forma, a liga Ti-35Nb tem atraído interesse na área de biomateriais. O Ni é um elemento abundante na Terra, é leve em peso, barato e, como a literatura tem relatado, exibe excepcional biocompatibilidade. A grande maioria destes estudos, assim como o verificado por este trabalho, relata bons resultados envolvendo a citotoxicidade das ligas compostas por Nb (Zhao et al., 2013; Park et al., 2013). Um estudo recente avaliou amostras porosas da liga Ti-25Nb, quanto ao potencial tóxico e concluiu que independente do grau de porosidade, Ti-25Nb é uma liga biocompatível que atendeu aos pré-requisitos para aplicação biomédica e a porosidade de 70% apresentou propriedades mecânicas e tamanho dos poros ideal (Xu et al., 2013).

De um modo geral, todas as ligas submetidas ao teste de conteúdo de proteína total exibiram capacidade significativa de produzir proteínas, seja no período de 3 ou de 10 dias, sendo este um fator importante que parece estar relacionado ao processo de osteogênese.

De acordo com Simão et al. (2007) o papel da fosfatase alcalina não está claro devido à complexidade no processo de extração e solubilização dessa enzima, presente em tecidos ósseos e/ou cartilagosos. Tal processo pode alterar sua estrutura, sua atividade catalítica e outras propriedades relacionadas à sua função. Sabe-se que a fosfatase alcalina é um importante marcador de diferenciação osteoblástica e que existe uma correlação entre a atividade de

fosfatase alcalina e a produção de matriz mineralizada (Sugawara et al., 1999; Beloti, Rosa, 2005).

Neste estudo, quando se comparou as ligas de Ti, verificou-se a formação de três grupos homogêneos distintos, sendo que a liga que apresentou a maior média de produção de fosfatase alcalina foi a Ti-6Al-4V, estatisticamente semelhante às ligas Ti-13Nb-13Zr e Ti-35Nb-7Zr-5Ta, e com diferença estatística significativa somente em relação às ligas com menores médias, TiCP e Ti-35Nb. Somente a liga Ti-6Al-4V apresentou diferença estatística significativa em relação às ligas TiCP e Ti-35Nb.

Quando o fator tempo foi avaliado, observou-se a que os períodos de 3 e 10 dias foram diferentes estatisticamente entre si, sendo que aos 3 dias de cultura celular houve maior atividade da fosfatase alcalina.

Diferentemente dos outros testes, não houve diferença estatística quando a associação do período de cultura celular e liga de Ti foi avaliada.

Os resultados obtidos a partir deste teste contrariaram os resultados relatados por Lincks et al. (1998), no qual os níveis de fosfatase alcalina foram maiores para o TiCP quando comparado à liga Ti-6Al-4V, o oposto ao verificado pelo presente estudo. De acordo com o estudo de 1998, a fosfatase alcalina é um marcador inicial da diferenciação osteoblástica e quando a atividade desta enzima ocorre em todas as membranas celulares ela é encontrada em maiores quantidades nas células que mineralizam sua matriz, como os osteoblastos. Por outro lado, os resultados obtidos neste estudo

corroboram com os apresentados por Guo et al. (2013b) os quais verificaram que as médias da atividade da fosfatase alcalina foram maiores para Ti-35Nb-3Zr-2Ta do que para a liga Ti-6Al-4V a partir do período de 4 dias de cultura celular.

As médias da atividade de fosfatase alcalina das ligas Ti-6Al-4V e Ti-13Nb-13Zr foram próximas e semelhantes estatisticamente de acordo com os resultados deste estudo. No entanto, Samuel et al. (2010) observaram em seu estudo também com cultura primária de células derivadas da calvária de ratos, que a atividade desta enzima foi consideravelmente maior para a liga Ti-13Nb-13Zr, indicando maior diferenciação para células ósseas após o período de 6 dias. No presente estudo houve maior atividade de fosfatase alcalina no período de 3 dias de cultura celular.

De maneira geral, todas as ligas estudadas permitiram atividade satisfatória da fosfatase alcalina, sendo que suas médias foram estatisticamente semelhantes. Este resultado é importante já que evidencia o potencial dos osteoblastos formarem matriz mineralizada sobre amostras de todas as ligas estudadas.

A mineralização da matriz é o evento final da formação óssea (Rosa et al., 2008). Em estudos utilizando culturas osteogênicas a mineralização é considerada como parâmetro funcional, e, *in vitro*, reflete o avanço da diferenciação das células (Hoemann et al., 2009).

Neste estudo, em relação à formação dos nódulos de mineralização, a análise intergrupos mostrou que a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta foi a que apresentou maiores médias, seguida pela liga Ti-35Nb, semelhantes estatisticamente. O TiCP e a liga Ti-13Nb-13Zr

apresentaram as menores médias, e foram estatisticamente diferentes entre si e entre Ti-35Nb-7Zr-5Ta e Ti-6Al-4V.

Quando se fixou o período de tempo de cultura, verificou-se diferença estatística entre 14 e 21 dias, sendo que as maiores médias de formação de nódulos de mineralização foram as obtidas aos 14 dias de cultura celular.

Quanto à associação entre períodos de cultura e tipo de liga de Ti, as ligas Ti-35Nb-7Zr-5Ta e Ti-35Nb aos 14 dias foram semelhantes entre si e diferiram estatisticamente de todos os demais grupos em ambos os períodos.

Os resultados de formação de nódulos de mineralização expostos neste estudo concordam em parte com o apresentado por Guo et al. (2013a) no qual a liga Ti-35Nb-3Zr-2Ta apresentou maior deposição de matriz mineralizada do que a liga Ti-6Al-4V. No entanto, ao contrário do que se pôde observar neste estudo, Guo et al. (2013) verificaram que as médias de formação de matriz mineralizada aumentaram com a progressão do tempo.

Assim como foi expresso nos testes anteriores, a liberação de Al e V também pode influenciar negativamente as médias de formação de matriz mineralizada, já que pode alterar também a expressão do fenótipo osteoblástico em células mesenquimais indiferenciadas, comprometendo a formação de tecido ósseo normal (Park et al., 2013).

Em vista dos resultados apresentados nos testes de atividade da fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização, pode-se sugerir que possa haver a relação entre os dois,

já que a liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta apresentou a maior média para a formação de nódulos de mineralização e exibiu uma das maiores médias no teste de atividade da fosfatase alcalina, estatisticamente semelhante à liga com maior média. Da mesma forma, a liga Ti-6Al-4V apresentou a maior média no teste de fosfatase alcalina e foi semelhante estatisticamente à segunda maior média no teste de formação de nódulos de mineralização. Estes resultados concordaram com o descrito por Sugawara et al. (1999), que observaram que a atividade da fosfatase alcalina é essencial no processo de mineralização da matriz e sugeriram que o aumento na atividade da fosfatase alcalina implica em maior formação de matriz mineralizada. No entanto, de acordo com Simão et al. (2007), esta correlação ainda não está totalmente esclarecida.

A principal causa da perda de implantes é a reação inflamatória causada pela liberação de partículas do material do implante para os tecidos adjacentes, os quais são compostos principalmente de macrófagos ativados e fibroblastos, além de alguns linfócitos T (Goodman, 2007; Taki et al., 2007). A cascata de eventos por trás da perda do implante inclui a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e a produção de citocinas pró-reabsortivas pelos osteoblastos e fibroblastos (Okafor et al., 2006; Taki et al., 2007). Experimentos *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado que partículas de diversas características são fagocitadas pelos macrófagos, levando à ativação da produção de uma variedade de citocinas inflamatórias e enzimas proteolíticas, incluindo as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e etc) e o fator de necrose

tumoral α (TNF- α), as quais induzem a diferenciação e maturação osteoclástica e subsequente reabsorção óssea (Trindade et al., 2001; Masui et al., 2005; Goodman et al., 2006; Vallés et al., 2006). Estes mediadores apresentam uma variedade de efeitos, incluindo a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, que desencadeiam o acúmulo de células imunes e inflamatórias na região. Adicionalmente, estudos sugerem que a resposta imune aos debrís metálicos provenientes de implantes é inespecífica mediada por macrófagos, sendo que quando há a presença de linfócitos, são mediadas por estes (Wooley et al., 1996; Hercus, Revell, 2001).

A produção de IL-6 e TNF- α pode ser aumentada na presença de partículas de metais. Estas citocinas apresentam papel crucial na resposta inflamatória, pois podem levar à osteólise ao redor do implante. Em particular, TNF- α é um potente mediador da reabsorção óssea e também libera sinais para a ativação dos linfócitos. Por sua vez, IL-6 é uma citocina derivada dos linfócitos, que influencia a atividade osteoclástica e remodelação óssea (Borish, Steinke, 2003).

Cachinho et al. (2013) compararam a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ e TNF- α em Ti e suas ligas. Seus resultados demonstraram que IL-6 foi a citocina detectada em maior quantidade, porém sem diferenças estatísticas entre as ligas e tempos de cultura. Estes resultados concordam parcialmente com o verificado no presente estudo, já que as ligas estudadas apresentaram médias semelhantes, no entanto houve diferença estatística entre os

períodos de 7 e 14 dias de cultura, com aumento da produção desta citocina proporcionalmente ao tempo.

Quanto à produção de TNF- α , Cachinho et al. (2013) verificaram uma tendência à diminuição de sua produção com a progressão do tempo, o que neste estudo foi observado somente com as ligas Ti-35Nb-7Zr-5Ta e Ti-35Nb, porém sem diferenças estatísticas. Em comparação com o controle poliestireno, que apresentou as menores médias, as ligas Ti-35Nb-7Zr-5Ta e Ti-35Nb foram estatisticamente diferentes. Estes resultados concordam com o verificado por Cachinho et al. (2013), os quais concluíram que produção de IL-6 e TNF- α aumentou na presença de partículas de metais. No entanto, estas ligas apresentaram média de produção de TNF- α semelhantes ao TiCP, considerado o biomaterial mais inerte utilizado para fins protéticos. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, e tendo como base o preconizado para o TiCP como biomaterial, pode-se sugerir que a presença de partículas provenientes das ligas de Ti aumenta a produção de IL-6 e TNF- α , porém em níveis toleráveis e que não comprometem a integridade do implante em função da resposta inflamatória que originam.

O fator de crescimento transformador beta 1(TGF- β 1), atua na osteogênese e na ativação dos osteoblastos para que produzam a matriz óssea, completando, assim, a remodelação óssea iniciada pela reabsorção decorrente da ação das citocinas IL-6 e TNF- α . As irregularidades presentes na superfície do osso, devido à atividade dos osteoclastos, representam um fator importante para a formação do osso normal, pois durante o processo de remodelação e cicatrização

óssea os osteoblastos maturam e mineralizam sua matriz extracelular em áreas em que o osso sofreu um pré-condicionamento pelos osteoclastos. Esta ação osteoclástica cria microporosidades, fazendo com que as células alojadas nestas regiões produzam maiores níveis de fatores que potencializam a osteogênese, principalmente o TGF- β 1 (Bonewald, Dallas, 1994; Boyan et al., 2003; Janssens et al., 2005)

Em um estudo recente realizados por Olivares-Navarrete et al. (2013), os autores verificaram que a superfície porosa potencializou a produção de TGF- β 1 em ligas de Ti, quando comparada à superfície lisa. De acordo com estes autores, os osteoblastos produzem TGF- β 1 na forma latente e a estocam na matriz extracelular. Em sua forma ativa, TGF- β 1 estimula a diferenciação osteoblástica e síntese de matriz, enquanto inibe a atividade dos osteoclastos, fechando o ciclo da remodelação óssea. Neste estudo, as células cultivadas diretamente sobre o fundo do poço de poliestireno apresentaram médias semelhantes estatisticamente às células cultivadas sobre as amostras porosas das novas ligas propostas. Além disso, estas ligas apresentaram médias de produção de TGF- β 1 semelhantes às ligas consagradas como biomateriais, em ambos os períodos de cultura. Pôde-se verificar também neste estudo, que a produção deste fator de crescimento aumentou conforme o tempo de cultura, comprovado pela análise estatística.

Os testes realizados nesta dissertação demonstraram que as ligas com estrutura porosa propostas não apresentaram citotoxicidade, e apresentam propriedades favoráveis ao desenvolvimento, proliferação, manutenção da viabilidade celular,

síntese de proteína total, atividade da fosfatase alcalina, formação de matriz mineralizada e produção de TNF- α , IL-6 e TGF- β 1.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos nesta dissertação foi possível concluir que amostras porosas do TiCP e das ligas Ti-6Al-4V, Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb e Ti-35Nb-7Zr-5Ta permitem a adesão, proliferação, viabilidade celular, síntese de proteína total, atividade de fosfatase alcalina, formação de nódulos de mineralização e ainda a produção de TNF- α , IL-6 e TGF- β 1 por células osteogênicas da calvária de ratos neonatos. Concluiu-se também que as ligas Ti-13Nb-13Zr, Ti-35Nb e Ti-35Nb-7Zr-5Ta foram semelhantes ou superaram as propriedades avaliadas em comparação com as ligas já consagradas Ti-6Al-4V e TiCP. Desta forma, estas novas ligas possuem grande potencial para emprego em implantes biomédicos.

8 REFERÊNCIAS

Afonso CRM, Ferrandini PL, Ramirez AJ, Caram R. High resolution transmission electron microscopy study of the hardening mechanism through phase separations in a beta-Ti-35Nb-7Zr-5Ta alloy for implant applications. *Acta Biomater.* 2010;(6):1625-29.

Al-Nawas B, Brugger U, Meijer HJ, Naert I, Persson R, Peruchi A, et al. A double-blind randomized controlled trial (RCT) of titanium-13zirconium versus titanium grade IV small-diameter bone level implants in edentulous mandibles – result from a 1-year observation period. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14(6):896-904.

Bainbridge JA, Revell PA, Al-Saffar N. Costimulatory molecule expression following exposure to orthopaedic implants wear debris. *J Biomed Mater Res.* 2001;(54):328-34.

Barbas A, Bonnet AS, Lipinski P, Pesci R, Dubois G. Development and mechanical characterization of porous titanium bone substitutes. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012;9:34-44.

Barter S, Stone P, Bragger U. A pilot study to evaluate the success and survival rate of titanium-zirconium implants in partially edentulous patients: results after 24 months of follow-up. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(7):873-81.

Beck GR Jr, Moran E, Knecht N. Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2. *Exp Cell Res.* 2003;288(2):288-300.

* 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

Beloti MM, de Oliveira PT, Gimenes R, Zaghete MA, Bertolini MJ, Rosa AL. *In vitro* biocompatibility of a novel membrane of the composite poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate. *J Biomed Mater Res A*. 2006;79(2):282-8.

Beloti MM, Martins W Jr, Xavier SP, Rosa AL. *In vitro* osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(1):48-54.

Beloti MM, Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Braz Dent J*. 2005;16(2):156-61.

Bennett JH, Carter DH, Alavi AL, Beresford JN, Walsh S. Patterns of integrin expression in a human mandibular explant model of osteoblast differentiation. *Arch Oral Biol*. 2001;46(3):229-38.

Bhattarai SR, Khalil KA, Dewidar M, Hwang PH, Yi HK, Kim HY. Novel production method and in-vitro cell compatibility of porous Ti-6Al-4V alloy disk for hard tissue engineering. *J Biomed Mater Res. A*. 2008;86(2):289-99.

Biesiekierski A, Wang J, Gepreel MA, Wen C. A new look at biomedical Ti-based shape memory alloys. *Acta Biomater*. 2012;8(5):1661–9.

Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J Cell Biochem*. 1994;55(3):350–7.

Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2 suppl):S460–75.

Bottino MC, Coelho PG, Henriques VAR, Higa OZ, Bressiani AHA, Bressiani JC. Processing, characterization, and *in vitro/in vivo* evaluations of powder metallurgy processed Ti-13Nb-13Zr alloys. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88(3):689-96.

Bottino MC, Coelho PG, Yoshimoto M, Koning B, Henriques VAR, Bressiani AHA et al. Histomorphologic evaluation of Ti-13Nb-13Zr alloys processed via powder metallurgy. A study in rabbits. *Mat Sci and Engin C*. 2008;28(2):223-7.

Boyan BD, Schwartz Z, Lohmann CH, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, et al. Pretreatment of bone with osteoclasts affects phenotypic expression of osteoblast-like cells. *J Orthop Res*. 2003;21(4):638-47.

Bracroft JD, Cook HC. *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. New York: Churchill Livingstone. Longman Singapore Publishers Ltd; 1994.

Branemark PI. Osseointegration and its experimental back-ground. *J Prosthet Dent*. 1983;50(3):399-410.

Brentel AS, de Vasconcellos LM, Oliveira MV, Graça ML, de Vasconcellos LG, Cairo CA, et al. Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(3):213-8.

Cachinho SCP, Pu F, Hunt JA. Cytokine secretion from human peripheral blood mononuclear cells cultured in vitro with metal particles. *J Biomed Mater Res Part A*. 2013;101(4):1201-9.

Callister WD. Propriedades mecânicas dos metais. In: *Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução*. 7ªEd. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos. 2007. Cap. 6, p. 131.

Chen Y, Wang X, Xu L, Liu Z, Kee do W. Tribological behavior study on Ti-Nb-Sn/hydroxyapatite composites in simulated body fluid solution. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012;10:97-107.

Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M, Corsi E, Anello T. Titanium-zirconium alloy narrow-diameter implants (Straumann Roxolid) for the rehabilitation of horizontally deficient edentulous ridges: prospective study on 18 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(10): 136-41.

Cortizo AM, Bruzzone L, Molinuevo S, Etcheverry SB. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology*. 2000;147(2):89-99.

Dabrowski B, Swieszkowski W, Godlinski D, Kurzydowski KJ. Highly porous titanium scaffolds for orthopaedic applications. *J Biomed Mater Res B App Biomater*. 2010;95(1): 53-61.

Dalal A, Pawar V, McAllister K, Weaver C, Hallab NJ. Orthopedic implant cobalt-alloy particles produce greater toxicity and inflammatory cytokines than titanium alloy and zirconium alloy-based particles *in vitro*, in human osteoblasts, fibroblasts, and macrophages. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(8):2147-58.

Delligiani DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*. 2001;22(1):87-96.

de Medeiros WS, de Oliveira MV, Pereira LC, de Andrade MC. Bioactive porous titanium: an alternative to surgical implants. *Artificial Organs*. 2008;32(4):277-82.

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.

Dewidar MM, Yoon HC, Lim JK. Mechanical properties of metals for biomedical applications using powder metallurgy process. *Metals Mater Int*. 2006;12(3):193-206.

Duvaizem JH, Fajardo AM, Barbosa LD, Bressiani AH, Takiishi H. Production of Ti-3Nb-13Zr alloy by PM for biomedical applications using zirconium oxide grinding bowl and balls. *Mater Sci Forum*. 2012;(727-728):102-7.

Eisenbarth E, Meyle J, Nachtigall W, Breme J. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials*. 1996;17(14):1399-403.

Eisenbarth E, Velten D, Muller M, Thull R, Breme J. Biocompatibility of beta-stabilizing elements of titanium alloys. *Biomaterials*. 2004;25(26):5705-13.

Faria PE, Carvalho AL, Felipucci DN, Wen C, Sennergy L, Salata LA. Bone formation following implantation of titanium sponge rods into humeral osteotomies in dogs: a histological and histometrical study. *Clin Implant. Dent Relat Res*. 2010;12(1):72-9.

Ferrandini PL, Cardoso FF, Souza SA, Afonso CRM, Caram R. Aging response to the Ti-35Nb-7Zr-5Ta and Ti-35Nb-7Ta alloys. *J Alloys Compd*. 2007;433(1-2):207-10

Franco R de L, Chiesa R, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Human osteoblastic cell response to a Ca- and P-enriched titanium surface obtained by anodization. *J Biomed Mater Res A*. 2010;88(4):841-8.

Frosch KH, Sondergeld I, Dresing K, Rudy T, Lohmann CH, Rabba J, et al. Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants. *J Orthop Res*. 2003;21(3):213-23.

Goia TS. Implantes porosos à base de titânio, avaliação *in vitro* e *in vivo* [tese]. São Paulo (SP): Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo; 2013.

Goodman SB, Ma T, Chiu R, Ramachandran R, Smith RL. Effects of orthopaedic wear particles on osteoprogenitor cells. *Biomaterials*. 2006;27(36):6096–101.

Goodman SB. Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials*. 2007;28(34):5044–8.

Gough JE, Notingher I, Hench LL. Osteoblastic attachment and mineralized nodule formation on rough and smooth 45S5 bioactive glass monoliths. *J Biomed Mater Res A* 2004;68(4):640-50.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004;329(1):77-84.

Guo Y, Chen D, Cheng M, Lu W, Wang L, Zhang X. The bone tissue compatibility of a new Ti35Nb2Ta3Zr alloy with a low Young's modulus. *J Mol Med.* 2013a;31(3):689-97.

Guo Y, Chen D, Lu W, Jia Y, Wang L, Zhang X. Corrosion resistance and *in vitro* response of a novel Ti-35Nb-2Ta-3Zr alloy with a low Young's modulus. *Biomed Mater.* 2013b;8(5):055004.

Hallab NJ, Vermes C, Messina C, Roebuck KA, Glant TT, Jacobs JJ. Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG63 osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 2002;60(3):420-33.

Han CH, Johansson CB, Wennerberg A, Albrektsson T. Quantitative and qualitative investigations of surface enlarged titanium and titanium alloy implants. *Clin Oral Implants Res.* 1998;9(1):1-10.

Hercus B, Revell PA. Phenotypic characteristics of T lymphocytes in the interfacial tissue of aseptically loosened prosthetic joints. *J Mater Sci: Mater Med.* 2001;(10-12):1063-7.

Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. *In vitro* osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris).* 2009;57(4):318-23.

Hoerth RM, Katunar MR, Sanchez AG, Orellano JC, Cere SM, Wagermaier W et al. A comparative study of zirconium and titanium implants in rat: osseointegrations and bone material quality. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(2):411-22.

Howard EB, Timothy LG. *Metals hand-book.* 8 ed. Metals Park, Ohio: American Society for Metals;1995.

Hsu HC, Hsu SK, Tsou HK, Wu SC, Lai TH, Ho WF. Fabrication and characterization of porous Ti-7.5Mo alloy scaffolds for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24(3):645-57.

Jakobsen SS, Larsen A, Stoltenberg M, Bruun JM, Soballe K. Effects of as-cast and wrought cobalt-chrome-molybdenum and titanium-aluminum-vanadium alloys on cytokine gene expression and protein secretion in J774A.1 macrophages. *Eur Cells Mater*. 2007;14:45-55.

Jakobsen SS, Larsen A, Stoltenberg M, Bruun JM, Soballe K. Hydroxyapatite coatings did not increase TGF-beta and BMP-2 secretion in murine J774A.1 macrophages, but induced a pro-inflammatory cytokine response. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2009;20(4):455-65.

Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocrine Rev*. 2005;26:743-74.

Jell G, Notingher I, Tsigkou O, Notingher P, Polak JM, Hench LL et al. Bioactive glass-induced osteoblast differentiation: a noninvasive spectroscopy study. *J Biomed Mat Res* 2008;86(1):31-40.

Johansson CB, Han CH, Wennerberg A, Albrektsson T. A quantitative comparison of machined commercially pure titanium and titanium-aluminum-vanadium implants in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13(3):315-21.

Karahalil B, Kadioglu E, Tuzuner-Oncul AM, Cimenc E, Emerce E, Kisnisci RS. Micronucleus assay assessment of possible genotoxic effects in patients treated with titanium alloy endosseous implants or miniplates. *Mutat Res*. 2014;760:70-2.

Kasemo B. Biocompatibility of titanium implant: surface science aspects. *J Prosthet Dent*. 1983;49(6):832-7.

Kaufman AM, Alabre CI, Rubash HE, Shanbhag AS. Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr, and alumina particles: analysis of multiple cytokines using protein arrays. *J Biomed Mater Res*. 2008;84(2):464-74.

Khan MA, Williams RL, Williams DF. The corrosion behavior of Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in protein solutions. *Biomaterials*. 1999;20(7):631-7.

Laheurte P, Prima F, Eberhardt A, Goriant T, Wary M, Pattor E. Mechanical properties of low modulus beta titanium alloys designed from the electronic approach. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2010;3(8):565-73.

Lemons JE, Dietsch-Misch F. Biomateriais utilizados em implantes dentários. In: Misch CE. *Implantes dentários contemporâneos*. 2^a ed. São Paulo: Santos; 2006. Cap. 20. p. 271-302.

Li JP, Habibovic P, Van der Doel M, Wilson CE, de Wijn JR, Van Blitterswijk CA, et al. Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition. *Biomaterials*. 2007;28(18):2810-20.

Li JP, Li SH, Van Blitterswijk CA, de Groot K. A novel porous Ti6Al4V: characterization and cell attachment. *J Biomed Mater Res A*. 2005;73(2):223-33.

Li Y, Wong C, Xiong J, Hodgson P, Wen C. Cytotoxicity of titanium and titanium alloying elements. *J Dent Res*. 2010;89(5):493-7.

Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, et al. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*. 1998; 19(23):2219-32.

Lowry OH, Rsebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.

Marin E, Fedrizzi L, Zagra L. Porous metallic structures for orthopaedic applications: a short review of materials and technologies. *Eur Orthop Traumatol*. 2010;(1):103-9.

Masui T, Sakano S, Hasegawa Y, Warashina H, Ishiguro N. Expression of the inflammatory cytokines, RANKL and OPG induced by titanium, cobalt-chromium and polyethylene particles. *Biomaterials*. 2005;26(14):1695–1702.

McKee MD, Nanci A. Osteopontin: An interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connect Tissue Res*. 1996; 35(1-4):197-205.

Miura K, Yamada N, Hanada S, Jung TK, Itoi E. The bone tissue compatibility of a new Ti–Nb–Sn alloy with a low Young's modulus. *Acta Biomater*. 2011; 7(5):2320–6.

Morais LS, Serra GG, Muller CA, Andrade LR, Palermo EF, Elias CN, et al. Titanium alloy mini-implants for orthodontic anchorage: immediateloading and metal ion release. *Acta Biomater*. 2007; 3(3): 331–9.

Niinomi M. Fatigue performance and cytotoxicity of low rigidity titanium alloy, Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr. *Biomaterials*. 2003;24(16):2673-83.

Niinomi M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. *J Mechan Behavior Biomed Mater*. 2008;1(1):30-42

Niinomi M. Metallic biomaterials. *J Artif Organs*. 2008;11(3):105-10.

Niinomi M, Nakai M, Hieda J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. *Acta Biomater*. 2012; 8(11):3888–903.

Ning C, Ding D, Dai K, Zhai W, Chen L. The effect of Zr content on the microstructure, mechanical properties and cell attachment of Ti-35Nb-xZr alloys. *Biomed Mater*. 2010;5(4):045006.

Okafor CC, Haleem-Smith H, Laqueriere P, Manner PA, Tuan RS. Particulate endocytosis mediates biological responses of human mesenchymal stem cells to titanium wear debris. *J Orthop Res*. 2006;24(3):461–73.

Okasaki Y, Rao S, Ito Y, Tateishi T. Corrosion resistance, mechanical properties, corrosion fatigue strength and cytocompatibility of new Ti alloys without Al and V. *Biomaterials*. 1998;19(13):1197-215.

Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Gittens RA, Schneider JM, Haithcock DA, Ullrich PF, et al. Rough titanium alloys regulate osteoblast production of angiogenic factors. *Spine Journal*. 2013;13(11):1563-70.

Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of *in vitro* osteogenesis on titanium by chemically produce nanotopography. *J Biomed Mater Res A*. 2007;80(3):554-62.

Oréface RL, Pereira MM, Mansur HS. *Biomateriais fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006.

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extra-cellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990; 143(3):420-30.

Pamula E, Bacakova L, Filova E, Buczynska J, Bobrzynski P, Noskova L, et al. The influence of pore size on colonization of poly (L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells *in vitro*. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(1):425-35.

Park CH, Lee CS, Kim YJ, Jang JH, Suh JY, Park JW. Improved pre-osteoblast response and mechanical compability of ultrafine-grained Ti-13Nb-3Zr alloy. *Clin. Oral Implants. Res*. 2011;22(7):735-42.

Park JB. *Biomaterials: an introduction*. New York: Plenum Press;1980.

Park JW, Jang IIS, Suh JY. Bone response to endosseous titanium implants surface-modified by blasting and chemical treatment: a histomorphometric study in the rabbit femur. *J Biomed Mater Res. B Appl Biomater*;2008;84(2):400-7.

Park YJ, Song YH, An JH, Song HJ, Anusavice KJ. Cytocompatibility of pure metals and experimental binary titanium alloys for implant materials. *J of Dent.* 2013;41(12):1251-8.

Pereira KK, Alves OC, Novaes Jr AB, Oliveira FS, Yi JH, Zaniquelli O, et al. Progression of osteogenic cell cultures grown on microtopographic titanium coated with calcium phosphate and functionalized with a type i collagen-derived peptide. *J Periodontol.* 2013;84(8):1199-210.

Petri AD, Teixeira LN, Crippa GE, Beloti MM, Oliveira PT, Rosa AL. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on Titanium. *Braz Dent J.* 2010;21(6):491-8.

Pilliar RM. P/M processing of surgical implants: sintered porous surfaces for tissue-to-implant fixation. *Int J Powder Metall.* 1998;34(8):33-45.

Rogers SD, Howie DW, Graves SE, Percy MJ, Haynes DR. *In vitro* human monocyte response to wear particles of titanium alloy containing vanadium or niobium. *J Bone Joint Surg Br.* 1997;79(2):311-5.

Rosa AL, Crippa GE, Oliveira PT, Taba JrM, Lefebvre LP, Beloti MM. human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(5):472-81.

Rosa AL, Kato RB, Castro Raucci LM, Teixeira LN, de Oliveira FS, Bellesini LS, et al. Nanotopography divres stem cell fate toward osteoblast differentiation through $\alpha 1\beta 1$ Integrin signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2014;115(3):540-8.

Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RHC, de Oliveira PT, Rosa AL. Chronic ethanol intake inhibits *in vitro* osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol.* 2008; 28(2):205-11.

Samuel S, Nag S, Nasrazadani S, Ukirde V, El Bouanni M, Mohandas A, et al. Corrosion resistance and *in vitro* response of laser-deposited Ti-Nb-Zr-Ta alloys for orthopedic implant applications. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 94(4):1251-6.

Santos DR, Pereira MS, Cairo CAA, Graça MLA, Henriques VAR. Isochronal sintering of the blended Elemental Ti-35Nb alloy. *Mater Sci Engin A*. 2008;472(1-2):193-7.

Saulacic N, Bosshardt DD, Bornstein MM, Berner S, Buser D. Bone apposition to a titanium-zirconium alloy implant, as compared to two other titanium-containing implants. *Eur Cell Mater*. 2012; 23:273-86.

Schneider SC. Obtenção e caracterização da liga Ti-13Nb-13Zr para aplicação como biomaterial [tese]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2001.

Schneider V, Oganov V, LeBlanc A, Rakmonov A, Taggart L, Bavulin A, et al. Bone and body mass changes during space flight. *Acta Astronaut*, 1995;36(8-12):463-6.

Schwartz HO, Novaes AB Jr, de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. *In vitro* osteogenesis on a microstructured titanium surface with addition submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res*. 2007;8(3):333-44.

Sicchieri LG, Crippa GE, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Pore size regulates cell and tissue interactions with PLGA-CaP scaffolds used for bone engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012; 6(2):155-62.

Sidney LE, Kirkham GR, Buttery L. Comparison of osteogenic differentiation of embryonic stem cells and primary osteoblasts, revealed by responses to IL-1 β , TNF- α and IFN- γ . *Stem Cells Dev*. 2014;23(6):605-17.

Simão AM, Beloti MM, Rosa AL, de Oliveira PT, Granjeiro JM, Pizauro JM, et al. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: a useful source of alkaline phosphatase. *Cell Bio Int*. 2007;31(11): 1405-13.

Sista S, Wen C, Hodgson PD, Pande G. The influence of surface energy of titanium-zirconium alloy on osteoblast cell functions *in vitro*. *J Biomed Mater Res A*. 2011;97A(1):27-36.

Song Y. Theoretical study of the effects of alloying elements on the strength and modulus of β -type bio-titanium alloys. *Mater Sci Engin A*. 1999;260(1-2):269-74.

Sugawara Y. Theoretical study of the effects of alloying elements on the strength and modulus of β -type bio-titanium alloys. *Material Science & Engineering - A - Structural Materials: Properties, Microstructure and Processing*. 1999;(1-2):269-274.

Taddei EB, Henriques VAR, Silva CRM, Cairo CAA, Bottino MC. Ensaio de citotoxicidade e influência do tratamento de solubilização na microestrutura da liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta para potenciais aplicações ortopédicas. *Rev Materia*. 2007;12(1):120-7.

Taki N, Tatro JM, Lowe R, Goldberg VM, Greenfield EM. Comparison of the roles of IL-1, IL-6, and TNFa in cell culture and murine models of aseptic loosening. *Bone*. 2007;40(5):1276-83.

Teixeira ER. Superfície dos implantes: o estágio atual. In: Dinato JC, Polido WD. *Implantes Osseointegrados: cirurgia e prótese*. São Paulo:Artes Médicas; 2004.

Teixeira LN, Crippa GE, Lefebvre LP, de Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. The influence of pore size on osteoblast phenotype expression in cultures grown on porous titanium. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(9):1097-101.

Thompson GJ, Puelo DA. Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation time course *in vitro*. *Biomaterials*. 1996;17(20):1949-54.

Trindade MCD, Lind M, Sun D, Schurman DJ, Goodman SB, Smith RL. In vitro reaction to orthopaedic biomaterials by macrophages and lymphocytes isolated from patients undergoing revision surgery. *Biomaterials*. 2001;22(3):253–9.

Vallés G, González-Melendi P, González-Carrasco JL, Saldana L, Sánchez-Sabaté E, Munuera L, et al. Differential inflammatory macrophage response to rutile and titanium particles. *Biomaterials*. 2006;27(30):5199–211.

Variola F, Brunski JB, Orsini G, Oliveira PT, Wazen R, Nanci A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale*. 2011;3(2):335–53.

Vasconcellos LMR, Leite DO, Nascimento FO, Vasconcellos LGO, Graça MLA, Carvalho YRC, et al. Porous titanium for biomedical applications: an experimental study on rabbits. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(2):e407-12.

Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça MLA, Vasconcellos LGO, Cairo CAA, Carvalho YRC. Design of dental implants, influence on the osteogenesis and fixation. *J Mater Sci Mater Med*. 2008a;19(8):2851-7.

Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça MLA, Vasconcellos LGO, Cairo CAA, Carvalho YRC. Porous titanium scaffolds produced by powder metallurgy for biomedical applications. *Mater Res*. 2008b;11(3):275-80.

Wang X, Li Y, Xiong J, Hodgson PD, Wen C. Porous TiNbZr alloy scaffolds for biomedical applications. *Acta Biomater*. 2009;5(9):3616-24.

Wang BL, Li L, Zheng YF. *In vitro* cytotoxicity and hemocompatibility studies of Ti-Nb, Ti-Nb-Zr and Ti-Nb-Hf biomedical shape memory alloys. *Biomed Mater*. 2010;5(4):044102.

Wazen RM, Lefevre L-P, Baril E, Nanci A. Initial evaluation of bone ingrowth into a novel porous titanium coating. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater.* 2010;94(1):64-71.

Wen CE, Mabuchi M, Yamada Y, Shimojima K, Chino Y, Asahina T. Processing of biocompatible porous Ti and Mg. *Scr Mater.* 2001;45(10):1147-53.

Wooley PH, Nasser S, Fitzgerald RH. The immune response to implant materials in humans. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;(326):63–70.

Xavier SP, Carvalho PSP, Beloti MM, Rosa AL. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. *J Dent.* 2003;31(3):173-80.

Xiong J, Li Y, Hodgson PD, Wen C. *In vitro* osteoblast-like cell proliferation on nano-hydroxyapatite coatings with different morphologies on a titanium-niobium shape memory alloy. *J Biomed Mater Res A.* 2010;95(3):766-73.

Xu J, Xiao-Jun W, Wang X, Jia-Zhang H, Zhang C, Muhammad H, et al. Potential use of porous titanium-niobium alloy in orthopedic implants: Preparation and experimental study of its biocompatibility *in vitro*. *PLoS ONE.* 2013; 8(11):e79289.

Zhang W, Li Z, Liu Y, Ye D, Li J, Xu L, et al. Biofunctionalization of a titanium surface with a nano-sawtooth structure regulates the behavior of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:4459–72.

Zhao D, Chang K, Ebel T, Qian Ma, Willumeit R, Yan M, et al. Microstructure and mechanical behavior of metal infection molded Ti-Nb binary alloys as biomedical material. *J Mechanical Behav Biomed Materials.* 2013; (28):171-82.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax (12) 3947-9010 / rigotti@fosjc.unesp.br / Guedes@fosjc.unesp.br



CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **018/2010-PA/CEP**, sobre “**Caracterização e estudo comparativo da biocompatibilidade de amostras de titânio, com superfície poroso, confeccionadas com diferentes ligas**”, sob responsabilidade de **LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS**, 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 este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 20 de outubro de 2010



Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora