



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Faculdade de Odontologia

DANIEL DE OLIVEIRA LEITE

**OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES POROSOS DE TITÂNIO
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO BIOMIMÉTICO**



2011

DANIEL DE OLIVEIRA LEITE

**OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES POROSOS DE TITÂNIO
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO BIOMIMÉTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2011

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

Profª Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

Profª Drª Renata Falchete do Prado

Faculdade de Fisioterapia
Escola Superior de Cruzeiro "Prefeito Hamilton Vieira Mendes" - ESC

São José dos Campos, 04 de julho de 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Agenor e Jane, pelos ensinamentos e dedicação durante todos esses anos, pelo amor incondicional e por iluminarem meu caminho através do brilho de seus olhares.

À minha família, em especial, meus avós José Leite, Maria, Américo (in memoriam) e Cida, e meus padrinhos Jarbas e Ione, pelo apoio, confiança e, principalmente, pelos gestos de carinho que expressam nobres sentimentos.

Aos meus amigos, pela cumplicidade e companheirismo, por me cativarem a cada dia e por simplesmente tornarem minha vida mais leve e divertida.

A todos vocês, só me resta dizer uma palavra, a mais preciosa dentre todas, e aquela que gostaria que seus corações ouvissem:

“Obrigado”

AGRADECIMENTOS

À minha grande amiga e orientadora **Profª Drª Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, responsável por grande parte da minha evolução profissional e pessoal, e a quem sou eternamente agradecido. Sem você, essa jornada teria sido mais árdua e menos motivadora. Lu, obrigado pelos ensinamentos, conselhos, conversas, preocupações e, principalmente, pela amizade durante todos esses anos. Se eu cheguei até aqui, é porque você esteve ao meu lado! Sem dúvida, você se tornou a pessoa mais importante nesse processo.

À **Profª Tit. Yasmin Rodarte Carvalho**, um grande exemplo de vida e sabedoria. Obrigado pela acolhida, desde os tempos de iniciação científica, pela confiança, pelo olhar afetuoso e, sobretudo, por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Sua dedicação e carinho traduzem sua nobreza de espírito!

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos UNESP, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. José Roberto Rodrigues**, pela oportunidade de realização do curso de graduação e pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, em especial a **Profª Drª Cristiane Yumi Koga Ito**, coordenadora do curso, pela dedicação a todos os discentes.

Ao **Pesquisador 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.

À **Profª Adj. Rosilene Fernandes da Rocha**, por acompanhar de perto todos os meus passos e sempre estar de braços abertos, mesmo nas horas difíceis.

À **Profª Drª Suely Carvalho Mutti Naressi**, pela constante dedicação e carinho, desde a época da graduação, e por me acolher, da forma mais afetuosa possível, durante o estágio docência.

À **Profª Drª Renata Falchete do Prado**, pelo apoio, atenção e, principalmente, pelos ensinamentos e colaboração em todos os momentos.

Às alunas de iniciação científica **Gabriela Esteves de Campos** e **Evelyn Luzia de Souza Santos** pela grande amizade que foi construída e pela inestimável colaboração nesta pesquisa.

À aluna de doutorado **Dennia Perez de Andrade** pelo carinho, companheirismo e amizade inquestionáveis, em todas as vitórias e obstáculos.

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

A todos os funcionários da Divisão de Materiais do IAE/CTA, em especial, **Elizabeth Godoy César Salgado, Rogério Duque de Gonçalves, Leonildo Gênova, Dario Sumizo Yamagishi, João Bernardes de Oliveira, João Marcos Kruszynski de Assis, José Luis de Oliveira (Gil), João Batista Rodrigues e Luis Príncipe Duarte** pelo apoio, disponibilidade e auxílio inestimáveis durante a fase de confecção e caracterização das amostras utilizadas nesta pesquisa.

Aos funcionários do Biotério da FOSJC **Lourival Jacob, Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e Marco Antônio Corrêa Alfredo**, pelo enorme colaboração durante a fase cirúrgica deste estudo.

Ao **Prof. Ivan Balducci** pelo auxílio indispensável durante a análise estatística deste trabalho.

Aos amigos do curso de mestrado, em especial as alunas **Érika Cristina Sbrisse Pereira, Jucely Aparecida da Rosa, Isabel Chaves Silva Carvalho, Mônica Ghislaine Oliveira Alves, Luana Galvão Martins e Aretha Graziela Vilela de Sousa**, pela amizade, colaboração e pelos momentos de descontração durante este período.

A todos os **animais experimentais**, o meu mais profundo respeito.

Enfim, a todos os **meus amigos**, que de forma direta ou indireta, contribuíram para mais essa etapa da minha vida, meu muito obrigado!

均
衡

Equilibrio

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Osseointegração	15
2.2 Titânio como Biomaterial	17
2.3 Topografia de Superfície	20
2.4 Recobrimento de Superfície	25
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Confeção dos Implantes de Titânio	32
4.1.1 Análise Metalográfica em MEV	37
4.2 Tratamento Biomimético	38
4.2.1 Análise por EDS	43
4.3 Procedimento Cirúrgico	44
4.4 Análise Histológica da Neoformação Óssea	47
4.5 Análise Histomorfométrica da Neoformação Óssea	51
5 RESULTADOS	53
5.1 Análise Metalográfica em MEV	53
5.2 Análise por EDS	56
5.3 Análise Histológica da Neoformação Óssea	57
5.4 Análise Histomorfométrica da Neoformação Óssea	65
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	83
8 REFERÊNCIAS	84
ANEXO	92

Leite DO. Osseointegração de implantes porosos de titânio submetidos ao tratamento biomimético [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

Atualmente, as pesquisas em Implantodontia enfatizam modificações na superfície dos implantes, visando melhorar a osseointegração. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da porosidade, bem como do tratamento biomimético (TB), na osteogênese *in vivo* em implantes de titânio. Foram confeccionados, por meio da metalurgia do pó, implantes de titânio puro grau 2, que foram divididos em seis grupos: a) G1: denso; b) G2: 40% de porosidade; c) G3: 50% de porosidade; d) G4: G1 + TB; e) G5: G2 + TB; f) G6: G3 + TB. Inicialmente, as amostras foram caracterizadas por análise metalográfica e por espectroscopia por energia dispersiva (EDS). Em seguida, os implantes foram inseridos nas tíbias de dezesseis coelhos da raça Nova Zelândia, para avaliar a reparação óssea peri-implantar, por meio de análise histológica e histomorfométrica. Como padronização, os implantes G1, G2 e G3 foram inseridos na tíbia direita e G4, G5 e G6 na esquerda. Quatro coelhos, selecionados aleatoriamente, foram submetidos à eutanásia, 01, 02, 04 e 08 semanas após a cirurgia. Os dados da análise metalográfica foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e a análise histomorfométrica foi avaliada pelos testes ANOVA e Tukey. Os resultados da metalografia confirmaram porosidade de 40 e 50%, e revelaram poros com tamanho médio de 370 μm e interconexão entre os mesmos. Na análise por EDS foi observada a presença de íons Ca e P, caracterizando o sucesso do TB. Na análise histológica observou-se neoformação óssea, inclusive para o interior dos poros, independente do tipo de implante ou do tempo. Na análise histomorfométrica, verificou-se maior neoformação óssea em G5 e G6, e menor em G1, sendo que ambas as condições mostraram diferença estaticamente significativa em relação aos demais grupos. Concluiu-se que o TB associado à porosidade exerce influência positiva na neoformação óssea.

Palavras-chave: Implantes. Titânio. Superfície porosa. Tratamento biomimético. Osteogênese. Osteocondução.

Leite DO. Osseointegration of porous titanium implants submitted to biomimetic treatment [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

Researches in implantodontology have been recently focusing on implant surface modifications aiming to improve osseointegration. Thus, the purpose of the present study was to evaluate *in vivo* the influence of titanium implants surface porosity and surface biomimetic treatment (BT) on osteogenesis. Grade 2 pure titanium implants were fabricated by means of powder metallurgy and divided into six groups: a) G1: dense; b) G2: porosity of 40%; c) G3: porosity of 50%; d) G4: G1 + BT; e) G5: G2 + BT; and f) G6: G3 + BT. The samples were initially characterized by metallographic analysis and energy-dispersive spectroscopy (EDS). The implants were then placed into the tibia of sixteen New Zealand rabbits in order to evaluate the peri-implant bone repair by means of histological and histomorphometric analyses. As standardization, implants from groups G1, G2 and G3 were inserted into right tibias; while G4, G5 and G6 into left ones. Four randomly chosen rabbits underwent euthanasia 01, 02, 04 and 8 weeks after surgery. The results from metallographic analysis were analyzed by Kruskal-Wallis test and the histomorphometric results by ANOVA and Tukey tests. Metallographic results confirmed porosity between 40 and 50%, and revealed mean pore size of 370 μm and interconnection among them. EDS analysis detected the presence of Ca and P ions, confirming BT success. Bone neoformation, including into the pores, was detected by the histological analysis regardless the type of implant or evaluated period. By the histomorphometric analysis, bone neoformation was statistically greater for G5 and G6 and statistically lesser for G1 in comparison to the other groups. It was concluded that BT associated with porosity exerts positive influence on bone neoformation.

Keywords: Implants. Titanium. Porous surface. Biomimetic treatment. Osteogenesis. Osteoconduction.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de implantes como forma de reabilitação de estruturas corpóreas perdidas vem apresentando notáveis avanços nos últimos anos. Atualmente, há uma grande variedade de implantes cirúrgicos disponíveis no mercado, sendo eles de diversos tamanhos e formatos. No entanto, independente do formato externo, o alvo principal dos pesquisadores é desenvolver um modelo de implante que apresente uma microtopografia de superfície bioativa e osteocondutora, a fim de promover melhor reparação óssea.

Especificamente, os implantes deveriam promover a aceleração no processo normal de cicatrização, resultando em uma matriz interfacial com composição e estrutura similares ao osso, além de apresentarem adequada propriedade biomecânica. Estas características visam permitir a rápida cicatrização, diminuir os insucessos e também o custo do procedimento, além de proporcionar maior satisfação aos pacientes. Para alcançar estes objetivos, torna-se importante entender a influência da superfície dos implantes nos eventos de cicatrização que ocorrem na interface osso-implante (Puleo, Nanci, 1999).

A superfície do implante apresenta grande importância no processo de osseointegração, uma vez que influencia o processo de ativação, diferenciação e proliferação de células com potencial osteogênico, o que refletirá na morfogênese óssea (Albrektsson et al., 1981; Davies, 2007; Kuzyk, Schemitsch, 2011). Em virtude disso, modificações topográficas e químicas dessa superfície têm sido de grande interesse em várias pesquisas. Melhorar o desempenho clínico em áreas com pobre quantidade ou qualidade óssea, acelerar a cicatrização, permitindo assim a utilização de protocolos de carga imediata ou precoce, e estimular o crescimento de tecido ósseo, a fim de possibilitar a

instalação de implantes em locais de rebordo alveolar insuficiente, são algumas das razões para o desenvolvimento dessas modificações na superfície dos implantes (Novaes Jr. et al., 2010).

A topografia e a estrutura química da superfície dos implantes são dois aspectos considerados importantes para que ocorra a osseointegração (Deporter et al., 1996; Puleo, Nanci, 1999; Brunski et al., 2000). Com relação à topografia dos implantes, a superfície porosa, com poros interligados, tem sido utilizada como uma alternativa bastante promissora, uma vez que possibilita a proliferação do tecido ósseo para o interior dos poros do implante (Kim et al., 2000; Frosch et al., 2002; Deporter et al., 2002; Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008a,b; Zhang et al., 2009; Vasconcellos et al., 2010a,b; Faria et al., 2010). Além disso, a interconexão dos poros favorece o fluxo de fluidos por toda a região do implante, possibilitando maior potencial para uma rápida osseointegração (Medeiros et al., 2008; Zhang et al., 2009). Este aspecto proporciona significativa melhora na taxa de neoformação óssea, favorecendo a fixação do implante ao osso (Kim et al., 2000; Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008a,b; Vasconcellos et al., 2010a,b).

Na medida em que a superfície do titânio não é suficientemente bioativa para induzir a neoformação óssea nos períodos iniciais de cicatrização, modificações químicas na superfície dos implantes, através de recobrimentos bioativos, também têm sido propostas pelos pesquisadores, no intuito de melhorar as propriedades biológicas que envolvem a interação osso-implante (Ong, Lucas, 1998; Piattelli et al., 1998; Feng et al., 2002; Zhang et al., 2009).

O fosfato de cálcio, em particular a hidroxiapatita, é um dos materiais mais utilizados para este objetivo, já que é ostecondutor e, conseqüentemente, bastante apropriado para recobrir materiais metálicos como o titânio. O recobrimento de implantes metálicos com materiais bioativos visa acelerar os estágios iniciais de formação óssea, reduzindo o tempo para osseointegração, bem como o tempo total de tratamento

(Feng et al., 2002; Wei et al., 2002; Habibovic et al., 2004; Baker et al., 2006).

Dentre as técnicas utilizadas para promover o recobrimento da superfície de implantes de titânio, o tratamento biomimético vem sendo atualmente estudado pelos pesquisadores como um método eficaz na produção de superfícies bioativas em materiais. Tal técnica consiste na formação de recobrimentos de fosfatos de cálcio, sob condições ambientais, através da imersão de um substrato em uma solução sintética de composição química e pH semelhantes aos do plasma sanguíneo e temperatura similar à do corpo humano (Abe et al., 1990; Andrade et al., 2000, 2002; Baker et al., 2006; Medeiros et al., 2008). Por meio dessas condições, é possível recobrir, até mesmo, materiais com formas complexas, como é o caso de implantes porosos (Nishiguchi et al., 2001).

Para promover integração tecidual e estimular a regeneração do tecido ósseo, interações na interface osso-implante devem ser otimizadas. Essas interações ocorrem em nível celular e, portanto, o desenvolvimento de novos biomateriais com características de superfície controladas, capazes de influenciar diretamente as células, é necessário.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O estudo dos biomateriais para implantes é um desafio complexo e multidisciplinar, que envolve não apenas a clínica cirúrgica, mas também outras áreas da ciência médica como a biologia, a química, a física e demais ciências tecnológicas (Kasemo, Lausmaa, 1988).

Nos últimos anos, o alvo principal dos estudos em implantodontia vem buscando a concepção de dispositivos que possam induzir e guiar uma rápida cicatrização do tecido ósseo de maneira controlada, previsível e orientada (Novaes Jr. et al., 2010). Essas características permitiriam não só uma recuperação mais rápida do paciente, mas também uma fixação mais estável entre o osso e o implante, permitindo assim a carga precoce ou imediata do dispositivo. Esses fatores, em congruência, permitiriam uma queda na morbidade em casos de reabilitação e uma diminuição nos custos em cuidados de saúde, além disso, teriam grande impacto nos aspectos psicológicos dos pacientes envolvidos (Puleo, Nanci, 1999).

Ciente dessa necessidade, várias modificações na superfície de implantes têm sido propostas para aumentar o contato osso-implante e acelerar o processo de reparação peri-implantar (Fontana e al., 2010). Nesse sentido, alterações topográficas e aplicações de revestimentos bioativos têm demonstrado um aumento efetivo na osteocondutividade de implantes, influenciando positivamente os fenômenos biológicos envolvidos nessa cicatrização (Barrère et al., 2003; Gan et al., 2004). Visando aprimorar esse conceito, torna-se cada vez mais necessário entender a influência da superfície dos implantes nos eventos que envolvem a osseointegração.

2.1 Osseointegração

A osseointegração é definida como uma união anatômica e funcional direta entre o osso vivo e organizado e a superfície do implante, estabelecendo-se uma união estável entre os mesmos (Branemark, 1983). Esse processo biológico é análogo a cicatrização óssea intramembranosa, como as que ocorrem em locais de fratura, e resulta na fixação de um biomaterial ao tecido ósseo (Kuzyk, Schemitsch, 2011).

O processo de cicatrização óssea peri-implantar pode ser dividido basicamente em dois estágios: inicial e tardio. A fase inicial gira em torno da resposta primária do hospedeiro frente ao biomaterial e envolve adsorção de proteínas na superfície do implante, ativação plaquetária, formação de coágulo, resposta inflamatória e, finalmente, formação de tecido ósseo imaturo, interligando o osso à superfície do implante. A fase tardia envolve o remodelamento do osso imaturo em osso lamelar (Kuzyk, Schemitsch, 2011).

O sangue é invariavelmente o primeiro tecido a entrar em contato com o implante após a sua instalação na loja cirúrgica. Esse contato inicial resulta em uma série de fenômenos biológicos que representam uma resposta evolutiva à introdução de um material estranho no organismo (Kuzyk, Schemitsch, 2011). Inicialmente, após o implante ser exposto à loja óssea, ocorre sua interação com água e íons, e a partir desta reação, há adsorção de proteínas não-específicas que farão parte de um substrato necessário para adesão, proliferação, diferenciação e síntese protéica de células de fenótipo osteoblástico (Steinemann, 1998; Puleo, Nanci, 1999). Albumina, glicosaminoglicanas, colagenase, fibronectina, proteínas do complemento e fibrinogênio são algumas das proteínas encontradas na superfície do implante após sua instalação (Liu et al., 2004).

Quando o implante é inserido no sítio cirúrgico, ocorre sangramento, ativação plaquetária e formação de coágulo, que culmina com a formação de uma rede de fibrina aderida à superfície do implante, cuja retenção é favorecida pela topografia superficial do mesmo (Davies, 2007). Essa rede de fibrina fornece os componentes mecânicos e bioquímicos necessários para a migração de células mesenquimais indiferenciadas e células leucocitárias, principalmente neutrófilos e monócitos (Kuzyk, Schemitsch, 2011). Os leucócitos atingirão o nível máximo de atividade entre o primeiro e o terceiro dia pós-cirúrgico, em que ocorrerá fagocitose de restos necróticos, ativação de fatores de crescimento e atração por quimiotaxia de células osteoprogenitoras para o local da lesão (Liu et al., 2004). Durante este período, a rede de fibrina se retrai gradativamente, acelerando o processo de angiogênese e diferenciação celular, dando origem a um tecido de granulação (Davies, 2003).

Em uma segunda etapa, com a presença de tecido de granulação na região entre a base óssea e o implante, inicia-se um processo de reparação tecidual muito semelhante ao reparo ocorrido em fraturas ósseas (Steinemann, 1998). Células mesenquimais indiferenciadas, que migraram para a superfície do implante através da rede de fibrina, irão se diferenciar em células de linhagem osteoblástica, pela ação de mediadores químicos liberados principalmente por plaquetas e leucócitos. Esse fenômeno é favorecido pela osteocondução do material. Segundo Ilan e Ladd (2002), osteocondutividade é o processo pelo qual o material se comporta como um arcabouço para o crescimento ósseo, mas sem induzir essa neoformação. É a propriedade do material de suportar o crescimento do tecido ósseo e o desenvolvimento das células osteoprogenitoras e facilitar orientação da neoformação vascular e a criação de novos sistemas harvesianos.

As células osteoprogenitoras da região irão gradativamente se proliferar e secretar matriz osteóide, que fornecerá a

base para a formação de tecido ósseo imaturo, que é menos mineralizado, mais celularizado e apresenta uma orientação aleatória de suas fibras (Kuzyk, Schemitsch, 2011). Segundo Davies (2003), esse processo envolve dois fenômenos distintos: a “osteogênese de contato”, que compreende a neoformação óssea a partir da superfície do implante, e a “osteogênese à distância”, que abrange a formação de tecido procedente da direção oposta, ou seja, da região de corte do osso.

A fase tardia do reparo peri-implantar envolve o remodelamento ósseo, durante o qual o osso imaturo é substituído por osso lamelar, que, por sua vez, apresenta grande potencial para receber e distribuir carga, sendo particularmente importante para a estabilização a longo prazo do implante. A remodelação óssea é um processo constante e ocorre durante toda vida clínica do implante (Kuzyk, Schemitsch, 2011).

O desenvolvimento desta cicatrização óssea peri-implantar, conhecida como osseointegração, é bastante complexo e depende de diversos fatores que devem ser levados em consideração para que o sucesso seja alcançado. Dentre esses fatores, existem aqueles relacionados ao próprio implante, tais como o tipo de material empregado, a forma e a topografia de superfície, ou aqueles diretamente ligados ao paciente, como a qualidade e a quantidade de tecido ósseo e as variáveis sistêmicas. Além disso, aspectos como a técnica cirúrgica e o tipo de carga empregada também podem interferir no desenvolvimento da interface osso-implante, levando a formação de tecido fibroso cicatricial (Albrektsson et al., 1981; Puleo, Nanci, 1999).

2.2 Titânio como Biomaterial

Desde a introdução do termo “osseointegração” por Branemark, diferentes biomateriais têm sido avaliados, *in vivo* e *in vitro*,

como substitutos de estruturas ósseas perdidas. Em aplicações ortopédicas e odontológicas, os metais têm demonstrado, até o momento, o maior potencial para receber carga a longo prazo, devido à sua excelente resistência mecânica e flexibilidade quando comparados a biomateriais alternativos, como polímeros e materiais cerâmicos (Ellingsen, 1998). Dentre esses metais, o titânio vem sendo amplamente utilizado na confecção de implantes, devido principalmente a sua adequada propriedade mecânica, resistência à corrosão e natureza inerte, o que o torna compatível na restauração da integridade estrutural de tecidos duros (Kasemo, Lausmaa, 1988; Kasemo, 1999; Jones, 2001; Feng et al., 2002; Liu et al., 2004; Braga et al., 2007).

Implantes cirúrgicos requerem propriedades mecânicas adequadas para que possam ser utilizados em aplicações ortopédicas e odontológicas (Liu et al., 2004). Dentre essas propriedades, a mais significativa em biomateriais é o módulo de tensão de elasticidade. Ter um baixo módulo elástico permite que o dispositivo implantado comporte-se semelhantemente ao osso em si, o que é desejável do ponto de vista biomecânico, evitando possíveis reabsorções (Wen et al., 2001). No entanto, o titânio apresenta um alto módulo de tensão de elasticidade (acima de $12,7 \times 10^4$ MPa), fazendo com que ele não responda bem às solicitações mecânicas relacionadas com aplicações cíclicas de tensão. Quando um implante de titânio é instalado no tecido ósseo, surge uma tensão de blindagem devido à diferença entre os módulos de elasticidades destes substratos, uma vez que o osso apresenta um baixo módulo (10^4 a $3,0 \times 10^4$ MPa). Um recurso que tem sido utilizado para minimizar esta tensão é a utilização da técnica da metalurgia do pó para produzir titânio com alta porosidade, reduzindo assim o “stress” causado no osso por tais implantes (Braga et al., 2007).

Além das propriedades mecânicas, a resistência à corrosão também é considerada uma das principais características quando se refere aos biomateriais (Liu et al., 2004). A grande importância

dessa proteção contra o ataque de fluidos corpóreos está principalmente relacionada com a liberação de íons no organismo e as falhas mecânicas desencadeadas no implante. A maioria das ligas metálicas contém elementos que, se forem liberados no corpo humano, podem ser prejudiciais a saúde; assim reações eletroquímicas e dispersões de íons a partir do dispositivo implantado devem ser limitadas. Além disso, fenômenos corrosivos podem formar pequenos defeitos na superfície do implante, provocando falhas e reduzindo sua resistência mecânica, em particular, sob condições de fadiga (Marin et al., 2010).

Por ser um dos metais mais reativos da natureza, o titânio, em contato com ar, apresenta a formação imediata e espontânea de uma camada de óxido em sua superfície, que constitui uma barreira efetiva sobre a superfície do metal (Steinemann, 1998; Jones, 2001; Feng et al., 2002). Essa camada de óxido é extremamente resistente, estável e forma um denso filme que protege o metal contra ataques químicos, incluindo a agressão de fluidos do corpo, minimizando o fenômeno de biocorrosão (Kasemo, Lausmaa, 1988; Liu et al., 2004).

Outra característica essencial em biomateriais é a biocompatibilidade. A natureza inerte do titânio, graças ao filme superficial de óxido, confere ao mesmo excelente biocompatibilidade, a qual justifica a sua utilização na reabilitação de estruturas corpóreas perdidas em aplicações biomédicas e odontológicas (Feng et al., 2002; Liu et al., 2004; Braga et al., 2007). Adicionalmente, a negatividade da camada de óxido de titânio também desempenha um papel fundamental na dinâmica do processo de osseointegração. Essa carga negativa superficial promove a atração de íons cálcio logo após a instalação do implante de titânio no sítio cirúrgico, o que irá favorecer a adsorção de macromoléculas como albumina e glicosaminoglicanas (Ellingsen, 1998), auxiliando assim na ligação da matriz extracelular à superfície do implante (Kasemo, 1999; Feng et al., 2002).

No entanto, a superfície do titânio, por si só, não é bioativa para acelerar ou induzir a neoformação óssea. Por isso, modificações físicas e químicas em sua superfície têm sido propostas para melhorar a osteocondutividade óssea e a bioatividade do titânio, permitindo assim um aprimoramento no controle das interações entre o osso e o implante e uma diminuição no tempo de tratamento (Ong, Lucas, 1998; Piattelli et al., 1998; Feng et al., 2002; Liu et al., 2004; Zhang et al., 2009).

2.3 Topografia de Superfície

A engenharia e a ciência de superfície com aplicação biomédica são campos de pesquisa relativamente novos, nos quais a caracterização da superfície dos biomateriais tem sido amplamente estudada, no intuito de aprimorar fenômenos biológicos (Jones, 2001). Dentro dessas características, a composição química, a topografia e a energia superficial representam papéis importantes na integração de um implante ao tecido ósseo (Deporter et al., 1996; Puleo, Nanci, 1999; Brunski et al., 2000). Nesse sentido, há um grande empenho dos pesquisadores em modificar a superfície dos implantes de titânio, visando melhorar a resposta celular, uma vez que as características de superfície influenciam diretamente na resposta inicial do processo de reparação peri-implantar (Ong, Lucas, 1998; Bowers et al., 1992; Frosch et al., 2003; Fujibayashi et al., 2004).

A topografia de superfície de implantes dentais e ortopédicos tem sido considerada muito importante no estudo da osseointegração, uma vez que pode induzir a uma multiplicidade de respostas celulares e alterar os eventos biológicos durante a cicatrização peri-implantar (Bowers et al., 1992; Vasconcellos et al., 2008a). Estudos

prévios têm relatado que essa topografia pode determinar a adsorção de biomoléculas e a sua orientação na superfície do implante, logo após a instalação do mesmo na loja cirúrgica (Bowers et al., 1992). Além disso, poderá influenciar na formação precoce do coágulo de fibrina, na ativação plaquetária e na produção de fatores de crescimento relacionados com tecido ósseo, interferindo assim diretamente no recrutamento, adesão, proliferação e diferenciação celular (Frosch et al., 2002; Kuzyk, Schemitsch, 2011). Adicionalmente, a topografia de superfície cria um meio tridimensional que poderá favorecer a neoformação óssea (Nguyen et al., 2004).

Há uma grande variedade de topografias de superfícies que visam controlar estas interações e estimular a função celular e conseqüentemente o reparo tecidual (Kim et al., 2000). Inicialmente, os implantes preconizados por Branemark apresentavam superfícies lisas e seguiam a geometria de roscas, a qual permitia interação imediata com o osso (Deporter et al., 1986). Atualmente, diversos tipos de topografia têm sido preconizados e empregados com o objetivo de aumentar sua rugosidade superficial e, conseqüentemente, sua fixação no tecido ósseo (Zinger et al., 2005). De acordo com Novaes Jr. et al. (2010), os principais métodos reportados na literatura para criar rugosidade superficial nos implantes são o ataque ácido, o jateamento, a anodização e a técnica do plasma spray. O objetivo dessas técnicas é obter diferentes topografias e rugosidades superficiais, no intuito de aprimorar a resposta osteogênica e a fixação do biomaterial (Liu et al., 2004).

Nos últimos anos, várias pesquisas têm desenvolvido implantes com superfície porosa, no intuito de aprimorar essa fixação do biomaterial ao tecido ósseo. Por possibilitar a proliferação do tecido ósseo para o interior dos poros do implante, essa superfície demonstra influência positiva sobre a atividade de osteoblastos (Bobyne et al., 1980; Deporter et al., 1996; Pilliar, 1998; Bram et al., 2000; Deporter et al., 2002; Wei et al., 2002; Frosch et al., 2002, 2003; Brentel et al., 2006; Otsuki et

al., 2006; Li et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008a,b; Zhang et al., 2009; Faria et al., 2010; Wazen et al., 2010; Vasconcellos et al., 2010a,b). No entanto, a fabricação dessa estrutura porosa não é muito bem controlada por técnicas convencionais de produção, uma vez que tais não possibilitam produzir poros com dimensões definidas com precisão (Li et al., 2007).

Dentre os diversos processos aplicados para a confecção de implantes porosos à base de titânio, a técnica da metalurgia do pó vem sendo cada vez mais utilizada, em substituição aos processos metalúrgicos convencionais (Bram et al., 2000; Wen et al., 2001; Liang et al. 2003; Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008a,b; Medeiros et al., 2008; Vasconcellos et al., 2010a,b; Wazen et al., 2010; Faria et al., 2010). Esta técnica é utilizada para produzir compostos metálicos ou cerâmicos através da produção do pó e sua consolidação pela aplicação de pressão e calor em temperaturas abaixo do ponto de fusão do constituinte majoritário (Braga et al., 2007).

A técnica da metalurgia do pó permite a fabricação de superfícies com formas complexas, que podem assumir características similares ao formato de rede. Além disso, fatores fundamentais para um bom desempenho do implante, como o diâmetro, a configuração e a quantidade de poros, podem ser controlados por essa técnica (Braga et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008b). Baixo custo, controle da composição química do material, otimização das propriedades mecânicas, redução do número de etapas de fabricação e economia de matéria-prima são outras vantagens que contribuem positivamente para a sua utilização (Bram et al., 2000; Wen et al., 2001).

A osseointegração obtida com a utilização da superfície porosa é dada por meio do crescimento de tecido ósseo para o interior dos poros, fenômeno denominado “bone ingrowth” (Bobyne et al., 1980; Deporter et al., 1996; Deporter et al., 2002). Vários fatores têm demonstrado grande influência nessa osseointegração de implantes

porosos, tais como as características da estrutura porosa (tamanho, quantidade, forma e interconexão dos poros), a biocompatibilidade, a rigidez do implante, a estabilidade e o grau de micromovimentação do implante (Pilliar, 1998; Li et al., 2007). Dentre esses fatores, a estrutura porosa atua acelerando o processo de reparação óssea, além de aumentar significativamente a área para contato osso-implante (Frosch et al., 2002, 2003; Vasconcellos et al., 2008a,b; Vasconcellos et al., 2010a,b; Wazen et al., 2010; Faria et al., 2010), reduzindo assim, o tempo para fixação mecânica e o período total de tratamento (Kim et al., 2000). No entanto, para que isso ocorra, os poros da superfície dos implantes devem ser interligados, visando facilitar a proliferação de vasos sanguíneos e tecido para o interior da porosidade (Li et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008a,b; Zhang et al., 2009; Vasconcellos et al., 2010a,b).

Além da interconexão dos poros, outros fatores devem ser considerados na neoformação óssea para o interior do implante, incluindo a porcentagem de porosidade e o tamanho dos poros (Pilliar, 1998; Li et al., 2007). A alta porosidade facilita o transporte de fluidos corpóreos, beneficia a difusão de células para o interior do implante e promove maior proliferação de tecido ósseo, uma vez que aumenta a área para contato (Li et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008a). No entanto, deve-se haver um equilíbrio entre essa taxa de porosidade e as propriedades mecânicas do material (Li et al., 2007). Do ponto de vista morfológico, com relação ao tamanho dos poros, células semelhantes a osteoblastos são capazes de cruzar distâncias de até 600 μm , através da formação de pontes celulares. 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). Características topográficas como a área dos poros e a taxa de porosidade precisam ser aprimoradas, já que, até o momento, ainda há grande dificuldade de se correlacionar propriedades de superfície com

resultados clínicos. Logo, a microtopografia ideal para implantes porosos comerciais ainda não é conhecida (Svehla et al., 2000).

Brentel et al. (2006) e Vasconcellos et al. (2008a) avaliaram a reparação óssea ao redor de implantes de titânio puro grau 2, denso e poroso, confeccionados a partir da metalurgia do pó. Ambos inseriram os implantes em tíbias de coelhos e analisaram a neoformação óssea, histológica e histomorfometricamente. No estudo de Brentel (2006) as análises foram realizadas no período de 4 semanas e no de Vasconcellos (2008a), os animais foram eutanasiados 4 e 8 semanas após a instalação dos implantes. Os dados obtidos por ambos os autores permitiram concluir que os implantes porosos apresentaram maior área de contato com o tecido ósseo na região de interface, resultando em maior fixação do implante ao osso, melhorando assim a osseointegração.

Em 2010 (a), Vasconcellos et al. realizaram mais um estudo em que foi analisada a influência da porosidade e do tamanho dos poros na neoformação óssea, no período de 8 semanas, através de análise histológica e histomorfométrica. Para isso, foram confeccionados três tipos de amostras com variação na porosidade e no tamanho dos poros: G1 = 30%/180 μm , G2 = 30%/300 μm e G3 = 40%/180 μm . Os dados encontrados permitiram concluir que o aumento na porosidade e no tamanho dos poros influenciou positivamente a neoformação óssea ao redor e no interior dos implantes, uma vez que o grupo que apresentou menor porosidade e tamanho dos poros (G1) diferiu estatisticamente dos demais por apresentar menor taxa de formação óssea.

No mesmo ano, Wazen et al. (2010) avaliaram *in vivo* o crescimento ósseo em implantes de titânio denso com superfície porosa e compararam sua resposta osteogênica à implantes densos. As amostras estudadas continham 50% de seu volume em poros interconectados, com tamanho que variava de 50 a 400 μm , caracterizando maior área superficial para contato em relação às amostras densas. Ambos os implantes foram colocados em tíbia de ratos e avaliados por microscopia

eletrônica de varredura e microtomografia, no período de 2 semanas. Mesmo nesse curto intervalo de tempo, observou-se que as amostras com superfície porosa apresentaram um preenchimento ósseo significativamente maior em relação aos implantes densos, indicando que a porosidade tem a capacidade de sustentar a formação óssea, melhorando a osseointegração.

2.4 Recobrimento de Superfície

Implantes porosos de titânio, com adequada propriedade mecânica, têm sido uma questão importante nas pesquisas de biomateriais, uma vez que podem ser considerados um substituto para o tecido ósseo e uma alternativa para otimizar tratamentos em implantodontia. Este biomaterial melhora osseointegração devido à maior superfície específica em contato com osso quando comparados à implantes densos (Medeiros et al., 2008; Vasconcellos et al. 2008a, 2010a). No entanto, independente da topografia de superfície do titânio, a bioatividade desta superfície não é grande o suficiente para induzir a neoformação óssea em curto prazo (Ong, Lucas, 1998; Piattelli et al., 1998; Feng et al., 2002; Zhang et al., 2009). O titânio é um material bioinerte e não se adere quimicamente ao tecido ósseo, exceto em condições específicas. Por este motivo, pode ocorrer a formação de um tecido fibroso ao redor do implante (Liu et al., 2004).

Diversos estudos têm demonstrado maior osteocondutividade nos implantes de titânio que foram submetidos a tratamentos químicos e térmicos que induzem a formação de um revestimento bioativo na superfície do implante (Piattelli et al., 1999; Kim et al., 2000; Wei et al., 2002; Fujibayashi et al., 2004; Gam et al., 2004; Habibovic et al., 2004; Nguyen et al., 2004; Costa et al., 2005; Baker et

al., 2006). Estes tratamentos são processos específicos *in vitro*, capazes de formar fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita, na superfície dos implantes (Nishiguchi et al., 2001, Liang et al., 2003).

Nos últimos tempos, esses revestimentos de fosfato de cálcio vêm sendo amplamente investigados devido à sua semelhança química com a porção mineral óssea (Puleo, Nanci, 1999). Diversas técnicas químicas e físicas têm sido desenvolvidas para a deposição de finos recobrimentos sobre metais, no intuito de formar sobre eles uma camada superficial bioativa, capaz de se ligar quimicamente ao tecido ósseo, acelerando o processo de aposição óssea, principalmente nos períodos iniciais de cicatrização (Andrade et al., 2002; Feng et al., 2002; Wei et al. 2002; Habibovic et al., 2004; Baker et al., 2006). Além disso, substratos revestidos por fosfatos de cálcio permitem uma rápida fixação biológica entre o tecido ósseo e o implante (Novaes Jr. et al., 2010). No entanto, revestimentos gerados por algumas técnicas convencionais, demonstraram problemas clínicos em termos de integração com o substrato, reação inflamatória e subsequente falha do implante (Piattelli et al. 1999).

Dentre os métodos de aplicação de fosfatos de cálcio, o jateamento térmico por *plasma spray* tem sido a técnica mais utilizada comercialmente (Wei et al., 2002; Liu et al., 2004, Vasudev et al., 2004; Costa et al., 2005; Novaes Jr. et al., 2010). Essa técnica consiste na pulverização de partículas de cerâmica sobre a superfície do implante, a partir de um spray de plasma em alta temperatura (Liu et al., 2004; Novaes et al., 2010). Apesar de proporcionar uma superfície altamente osteocondutora, pesquisas tem relatado que essa técnica não permite o controle preciso da composição química e da estrutura dos cristais de fosfato de cálcio formados sobre o metal (Wei et al., 2002; Zaffe, 2005), o que pode provocar uma união mecânica e quimicamente instável e fraca entre o substrato metálico e o osso (Habibovic et al., 2004; Coelho et al., 2010). Segundo Zaffe (2005), não há uniformidade da espessura da

camada depositada sobre o metal, além disso, as altas temperaturas utilizadas na deposição por “plasma spray” afetam a morfologia e a estrutura cristalina do filme depositado. Essa temperatura elevada impede que a técnica do “plasma spray” seja aplicada em implantes com superfície de geometria complexa, ou ainda em materiais sensíveis ao calor, impossibilitando também a incorporação de agentes biologicamente ativos no revestimento durante o processo de pulverização (Barreré et al., 2003). Adicionalmente, os custos elevados e a possível delaminação do revestimento também se destacam como desvantagens da técnica “plasma spray”, o que têm levado ao seu desuso na prática clínica (Liang et al., 2003; Coelho et al., 2010; Novaes Jr. et al., 2010).

Em 1990, Abe et al. desenvolveram um procedimento que permite recobrir praticamente qualquer substrato com uma camada uniforme de hidroxiapatita biológica. Essa técnica, conhecida como tratamento biomimético, é um método capaz de promover a precipitação heterogênea de fosfatos de cálcio em substratos metálicos, por meio de soluções de íons, produzindo uma superfície bioativa que atuará aprimorando a integração do implante com o tecido ósseo (Kokubo et al., 1996, 1998; Andrade et al., 2000, 2002; Baker et al., 2006; Ohtsuki et al., 2007). As soluções mais utilizadas para este tipo de deposição são os fluidos corpóreos simulados (FCS), que imitam a composição mineral do plasma sanguíneo, sem a presença de células ou proteínas. As soluções propostas por Kokubo (1996), por Andrade (2000) e a solução salina balanceada de Hank (Zhang et al., 2009) são exemplos de fluidos comumente utilizados.

Segundo Andrade et al. (2000), métodos biomiméticos de revestimento de fosfatos de cálcio sobre titânio, baseiam-se na nucleação e crescimento do fosfato de cálcio em FCS a 37°C, após pré-tratamento térmico-químico da amostra metálica, no intuito de aumentar a adesão química da apatita na superfície de titânio. Este tratamento visa obter uma camada de apatita na superfície dos implantes de titânio, induzindo sua

bioatividade e conseqüentemente melhorando a osseointegração (Andrade et al., 2000; Barrère et al., 2003; Liang et al., 2003; Medeiros et al., 2008; Zhang et al., 2009). Além disso, estes materiais criam uma adesão química entre o implante e o osso, que, associada a diversas topografias de superfície, permite ancoragem mecânica na interface osso-implante (Baker et al., 2006).

O processo biomimético apresenta quatro principais vantagens: processamento a baixas temperaturas, podendo ser aplicado a qualquer substrato com sensibilidade térmica como os polímeros; formação de cristais de hidroxiapatita similares ao do tecido ósseo, contendo características de alta bioatividade e boa reabsorção; deposição sobre e no interior dos poros em amostras com geometria mais complexa; e incorporação de fatores estimulantes de crescimento ósseo (Habibovic et al., 2004).

Segundo Habibovic et al. (2004), o processo biomimético é uma das técnicas mais promissoras para a produção de fosfato de cálcio, uma vez que imita o processo de mineralização óssea. O controle da composição e crescimento do cristal de apatita por meio de alterações na composição do FCS, a incorporação de proteínas sem alteração de suas funções e sem a necessidade do tratamento térmico, são outras vantagens que tornam esta técnica bastante promissora (Ohtsuki et al., 2007).

Em 2003, Barrère et al. utilizaram revestimentos biomiméticos de fosfato de cálcio aplicados em implantes de liga de titânio denso (Ti6Al4V) e tântalo poroso, a partir da imersão das amostras em FCS a 37°C e, em seguida, a 50°C, por 24 horas. Amostras de implantes, revestidas e não revestidas foram instaladas na diáfise do fêmur de cabras adultas e a neoformação óssea foi avaliada nos períodos de 6, 12 e 24 semanas, por meio de análise histológica e histomorfométrica. Os resultados deste estudo demonstram que, em ambos os tipos de metais e topografias, o revestimento de fosfato de cálcio melhorou

significativamente o contato direto entre osso e implantes. Portanto, concluiu-se que o revestimento biomimético é altamente benéfico para a osseointegração e fixação de implantes a longo prazo.

Fujibayashi et al. (2004) avaliaram e compararam a resposta tecidual de implantes porosos de titânio recobertos com fosfato de cálcio à implantes, também porosos, mas que não foram revestidos por cerâmica. Neste estudo, os implantes com revestimento bioativo receberam um tratamento químico-térmico e posteriormente foram imersos em FCS por 7 dias a 36,5°C. Diferentemente da maioria dos estudos, as amostras foram instaladas em sítios não-ósseos (músculos dorsais de cães) e examinadas histologicamente após 3 e 12 meses. A formação óssea só foi observada no período de 12 meses nas amostras que receberam o tratamento de superfície, indicando uma possível osteoindução dos recobrimentos cerâmicos, sem a necessidade de agentes osteoindutores, como as proteínas morfogenéticas, por exemplo.

Em 2008, Machado avaliou a neoformação óssea em tíbias de coelho em três períodos (15, 30 e 45 dias), frente a implantes porosos de titânio, submetidos ao processo biomimético, através de análise histológica, histomorfométrica e teste mecânico. Neste estudo, os implantes foram submetidos a um pré-tratamento alcalino-térmico e, posteriormente, imersos em FCS por 14 dias a 37°C, para obtenção do recobrimento bioativo de hidroxiapatita. A partir dos resultados encontrados, concluiu-se que a porcentagem média de neoformação óssea nos implantes tratados foi maior, sendo observada diferença estatística no período de 15 dias. Além disso, o teste mecânico mostrou que os implantes tratados foram deslocados com maior tensão em comparação aos que não receberam tal tratamento, sendo observada diferença estatística nos três períodos de análise.

Em 2010, Zhao et al. estudaram a osseointegração de implantes de titânio poroso, com poros tridimensionalmente interconectados, tratados biomimeticamente, em que foram aplicados dois

tipos de pré-tratamentos: ácido-alkalino e alkalino-térmico. Após a realização dos pré-tratamentos, os implantes foram imersos em FCS, saturado de fosfato de cálcio, a 4°C por 24 horas e, posteriormente, a 37°C por mais 48 horas, no intuito de formar o revestimento de apatita sobre sua superfície. Em seguida, os implantes foram instalados em fêmures de cães e analisados histológica e histomorfometricamente após dois meses. Os resultados experimentais mostraram que os recobrimentos de apatita depositada na superfície dos implantes submetidos a ambos os pré-tratamentos, apresentaram morfologia e espessura diferentes. Entretanto, a análise histológica e histomorfométrica confirmaram excelente osseointegração nas duas condições, não sendo observada diferença estatística entre elas. Este estudo mostrou que tanto o tratamento ácido-alkalino, quanto o alkalino-térmico, pode ter a mesma eficiência na bioativação de titânio poroso.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da porosidade, bem como do tratamento biomimético, na osteogênese *in vivo* em implantes de titânio, por meio de análise histológica e histomorfométrica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para que este estudo fosse realizado, seu projeto inicial foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (nº 017/2010-PA/CEP - Anexo A). Após sua aprovação, a pesquisa foi desenvolvida em 4 etapas: confecção das amostras de implante, processamento biomimético, cirurgia de implantação das amostras em tíbias de coelho e, por fim, processamento tecidual das peças para análise histológica e histomorfométrica.

4.1 Confecção dos Implantes de Titânio

Os implantes de titânio idealizados para este estudo foram fabricados no Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial (DCTA) - Divisão de Materiais do Instituto de Aeronáutica e Espaço (AMR/IAE), por meio da técnica de metalurgia do pó. Foram confeccionados implantes de titânio denso e dois tipos de implantes porosos, que variavam de acordo com a porcentagem de poros, sendo um grupo confeccionado com 40% de poros e outro com 50%.

Para a confecção das amostras densas foi utilizado pó de titânio puro grau 2, com granulometria de 8 μm . Já para a fabricação das amostras porosas, os materiais utilizados (Figura 1) foram o pó de titânio, com as mesmas características, e a uréia em grânulos, com granulometria na faixa de 177 a 250 μm , que funcionou como agente espaçador permitindo assim que fossem obtidos os poros das amostras. A variação

na porcentagem de porosidade foi obtida pela quantidade de material espaçador adicionado ao pó de titânio. A escolha da uréia foi baseada em suas propriedades químicas, dentre elas sua capacidade de se decompor completamente em temperaturas relativamente baixas.



Figura 1 - Materiais utilizados na confecção dos implantes: a) uréia em grânulos com diâmetro entre 177 a 250 μm ; b) pó de titânio com granulometria de 8 μm .

O processamento dos implantes de titânio, por meio da metalurgia do pó, envolveu basicamente três etapas: a obtenção e a moagem dos pós, a conformação dos pós por prensagem e a sinterização.

Como o titânio puro e suas ligas são geralmente pouco dúcteis, foi necessária uma alternativa para reduzir o tamanho das partículas do pó até a granulometria desejada de 8 μm . O processo escolhido foi a hidrogenação/desidrogenação (HDH), que permitiu a moagem do titânio, uma vez que a sua hidrogenação, torna este metal mais frágil.

Uma vez obtido o pó de titânio, seguiu-se os processos de prensagem uniaxial e isostática. Para a confecção das amostras porosas,

inicialmente foi necessário realizar a mistura do pó de titânio com a uréia em grânulos, em misturador V (Treu S/A), por 50 minutos, a fim de se obter uma mistura homogênea. Em seguida, a mistura de uréia com o pó de titânio foi inserida em uma matriz de aço ferramenta VND, medindo 6,0 mm de altura por 3,5 mm de diâmetro (Figura 2). O conjunto foi conduzido a uma prensa hidráulica (Marconi, modelo MA. 0981-C) (Figura 3a) para a compactação uniaxial com pressão de 100 MPa.



Figura 2 - Matriz de aço, medindo 6,0 mm x 3,5 mm, utilizada para fabricação das amostras de titânio.

Em seguida, os implantes foram conduzidos para a prensa isostática (Paul Weber, tipo KIP 100E) (Figura 3b), com compactação a frio e pressão de 300 MPa. Na prensagem isostática, a compactação das partículas se deu no interior de um molde flexível, sobre o qual atuou um fluido pressurizado, assegurando assim uma distribuição homogênea da pressão sobre toda superfície do molde.

Posteriormente, as amostras foram levadas ao forno EDG 3000 (Figura 3c), a 200°C, por 2 horas, para a remoção da uréia, possibilitando a obtenção dos poros.

A etapa seguinte, sinterização, consiste em um processo de consolidação, em que as partículas do pó são unidas formando agregados de alta resistência mecânica, o que leva ao controle da porosidade da peça e aumento da sua densificação. A sinterização do titânio foi realizada em forno a vácuo de 10^{-7} toneladas, fabricado pela Thermal Technology, modelo ASTRO (Figura 3d), com ciclo térmico pré-determinado, com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e patamar de 1 hora na temperatura de 1200°C .

Para finalizar, a superfície dos implantes foi desgastada com brocas de acabamento em alta-rotação, no intuito de remover uma fina camada de titânio que se formou em decorrência de seu processamento. Em seguida, uma limpeza criteriosa das amostras com solução de água destilada e detergente neutro, em ultrassom (Cristófoli Biossegurança), foi realizada por 10 minutos, visando remover possíveis resíduos. Posteriormente, os implantes foram imersos em álcool 70%, sendo submetidos à ação do ultrassom por mais 10 minutos. Finalizando, as amostras foram colocadas em água destilada, por mais um ciclo de 10 minutos em ultrassom.



Figura 3 - Equipamentos utilizados na confecção dos implantes: a) prensa hidráulica uniaxial; b) prensa isostática; c) forno EDG 3000; d) forno a vácuo para sinterização.

As amostras densas foram confeccionadas da mesma maneira que as porosas, porém utilizando-se apenas pó de titânio puro grau 2. No entanto, tais espécimes não foram levados ao forno EDG 3000, já que não havia aditivo orgânico a ser removido.

Ao final, foi fabricado um total de 126 implantes de titânio, sendo 42 amostras de cada grupo: denso, com 40% de porosidade e com 50% de porosidade (Figura 4).

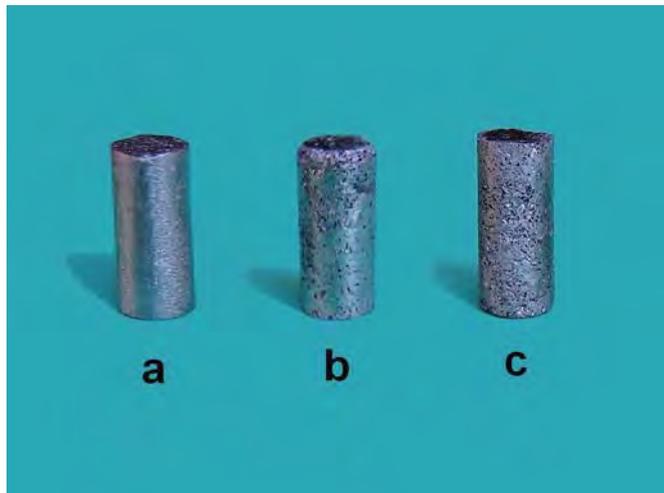


Figura 4 - Implantes confeccionados pela metalurgia do pó: a) amostra densa; b) amostra com porosidade de 40%; c) amostra com porosidade de 50%.

4.1.1 Análise Metalográfica em MEV

Cinco implantes de cada grupo foram analisados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) de duas maneiras: superficial e internamente. Inicialmente foi realizada a caracterização da microtopografia superficial, com aumento de 100x, a fim de avaliar qualitativamente a morfologia externa dos três tipos de implantes estudados.

Em seguida, esses implantes foram processados 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 μm (Erios), resultando em blocos de inclusão livres de ranhuras (Figura 5).



Figura 5 - Bloco de resina hemisseccionado, contendo amostra porosa de titânio polida na face de corte.

Após esse processamento, todas as amostras foram novamente analisadas em MEV para a caracterização de sua morfologia interna. Adicionalmente, os implantes porosos foram avaliados e quantificados quanto ao tamanho e porcentagem em área dos poros. Para isso, foram obtidas três imagens de cada amostra porosa, com aumento de 100x, totalizando 15 imagens por grupo. 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 de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%.

4.2 Tratamento Biomimético

Posteriormente a caracterização em MEV, metade do número total dos implantes de cada grupo foi submetida ao tratamento biomimético. Tal método permite a produção de revestimentos bioativos

sob condições ambientais, através da imersão do substrato em uma solução sintética de composição química, pH e temperatura semelhantes aos do plasma sanguíneo.

Para a realização do processamento biomimético, os implantes de titânio inicialmente foram submetidos a um pré-tratamento químico-térmico, em solução alcalina, visando aumentar adesão química da superfície do titânio aos núcleos de fosfato de cálcio do revestimento bioativo. Para isso, o tratamento alcalino foi realizado com solução de NaOH a 1M, em autoclave vertical (Fanem/São Paulo), à 127°C por 60 minutos. Em seguida, os implantes foram levados para o forno tubular EDG 3000, a 200°C por 60 minutos, para um tratamento térmico, com aquecimento de 10°C por minuto.

Após este pré-tratamento, as amostras foram conduzidas para o MEV, no intuito de verificar a formação de estruturas cristalinas em sua superfície (Figura 6), confirmando a efetividade dessa primeira etapa do processamento biomimético.

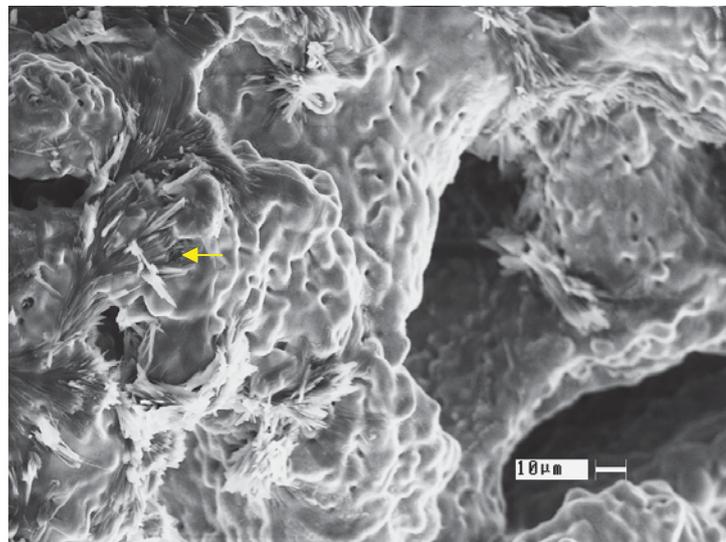


Figura 6 - Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura demonstrando estruturas cristalinas (←) após tratamento alcalino com NaOH na amostra porosa.

Posteriormente, uma solução de composição química, pH e temperatura semelhantes aos do plasma sanguíneo, conhecida como fluido corpóreo simulado modificado (FCSm), foi preparada. A solução FCSm utilizada neste estudo foi baseada na metodologia proposta por Andrade et al. (2000), cujos constituintes e concentrações estão descritos no Quadro 1. Para o preparo dessa solução, os reagentes foram pesados em balança analítica e dissolvidos individualmente, sob agitação moderada, em 20 ml de água destilada. As soluções obtidas foram misturadas e diluídas em mais 100 ml de água destilada, permanecendo sob agitação por 10 a 15 minutos, visando à homogeneização. Em seguida, o pH da solução foi ajustado na faixa de 7,0 a 7,5. Posteriormente esse fluido foi transferido para um balão volumétrico de 1 l e completado com 760 ml de água destilada.

Quadro 1 - Constituintes e suas concentrações no FCSm proposto por Andrade et al (2000)

Constituintes	Quantidade (g)
NaCl	7,940
NaHCO ₃	0,353
NaHPO ₄ .7H ₂ O	0,245
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,305
KCl	0,372
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,086
CaCl ₂	0,200

Vf = 1000mL

A solução iônica de FCSm preparada anteriormente foi utilizada para proporcionar um revestimento bioativo na superfície das amostras de titânio. Para isso, os implantes foram imersos em 20 ml dessa solução e mantidos em estufa a 37°C por 14 dias, sendo o fluido trocado a cada 2 dias. Após esse período, os implantes foram secos cuidadosamente, utilizando filtro de papel e, em seguida, analisados em MEV para observar a formação de cristais de fosfato de cálcio em sua superfície (Figura 7).

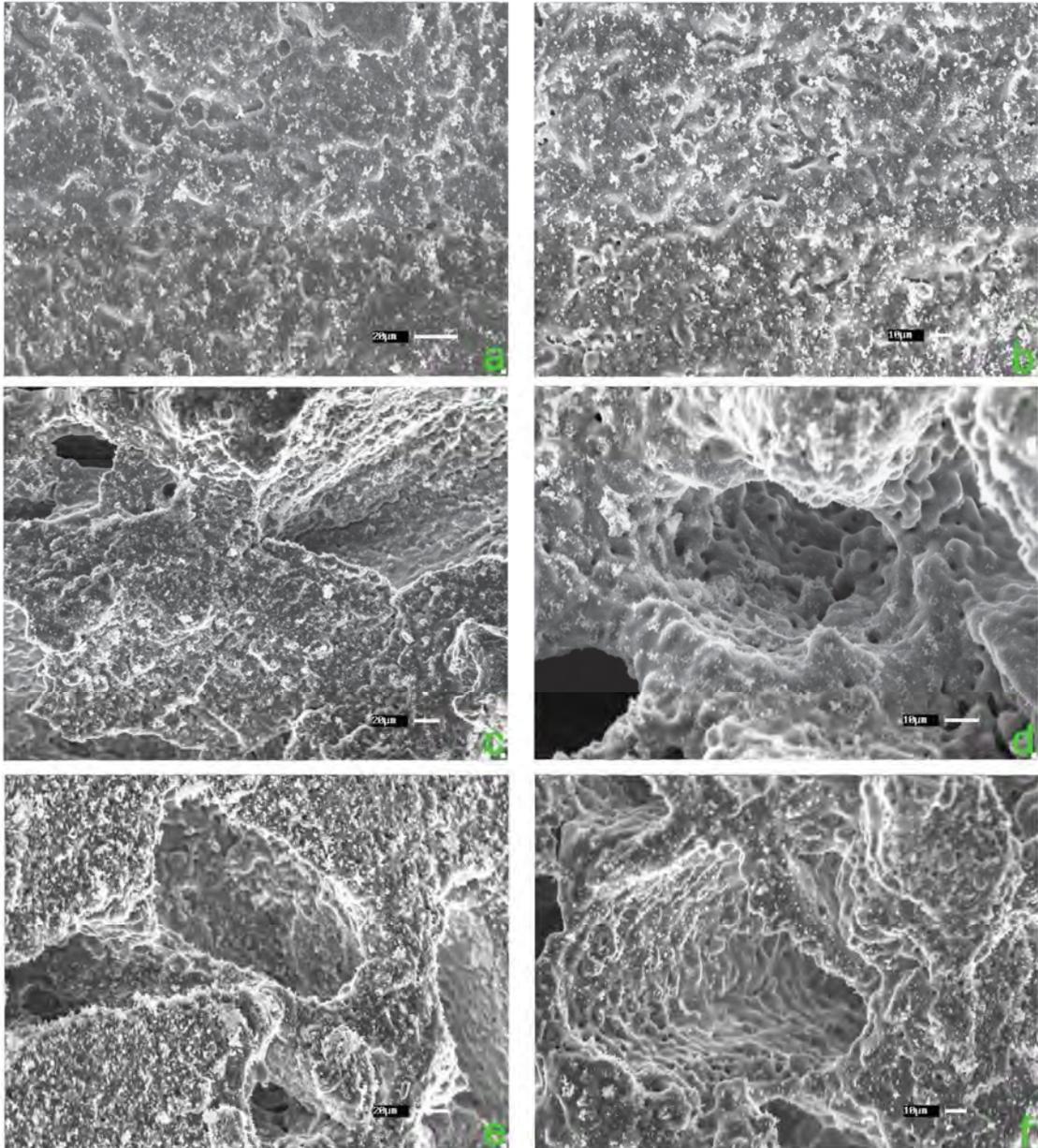


Figura 7 - Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura das amostras submetidas ao tratamento biomimético - Amostra densa com aumento original: a) 500x; b) 1000x. Amostra com 40% poros com aumento original: c) 500x; d) 1000x. Amostra com 50% poros com aumento original: e) 500x; f) 1000x.

Após a finalização do processamento biomimético, as amostras foram divididas em seis grupos (Quadro 2).

Quadro 2 - Divisão dos implantes

G1	Implante denso de Ti
G2	Implante de Ti com 40% de poros
G3	Implante de Ti com 50% de poros
G4	Implante denso de Ti, submetida ao tratamento biomimético
G5	Implante de Ti com 40% de poros, submetido ao tratamento biomimético
G6	Implante de Ti com 50% de poros, submetido ao tratamento biomimético

4.2.1 Análise por EDS

As alterações estruturais na superfície das amostras submetidas ao tratamento biomimético foram caracterizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura acoplada a um espectrômetro de energia dispersiva (EDS) (Figura 8), visando determinar os elementos presentes na superfície das amostras após imersão em FCSm.



Figura 8 - Microscópio eletrônico de varredura acoplado ao espectrômetro de energia dispersiva.

4.3 Procedimento Cirúrgico

Previamente ao procedimento cirúrgico, todos os implantes foram embalados em papel grau cirúrgico e enviados à Embrarad (Empresa Brasileira de Radiações Ltda – Cotia/SP), onde foram submetidos à esterilização por radiação ionizante, com 20 KGY de carga.

Dezesseis coelhos albinos da raça Nova Zelândia, pesando cerca de 4,0 kg, com 5 meses, foram utilizados neste estudo. Previamente à cirurgia de implantação, os animais foram pesados e anestesiados por via intramuscular, com uma mistura de 13 mg/kg de solução aquosa a 2,3 g de cloridrato de xilazina (Anasedan – Vetbrands) substância sedativa analgésica e relaxante muscular, com 33 mg/Kg de quetamina (Dopalen - Agibrands do Brasil Ltda.), anestésico geral. Anestésico local composto por cloridrato de prilocaína a 3% associado à felipressina 0,03 UI/ml (Citanest a 3%® – Dentsply) também foi utilizado.

Após a anestesia dos animais, os locais cirúrgicos das tíbias direita e esquerda foram submetidos à raspagem dos pêlos e à anti-sepsia do local com solução de álcool iodado. A incisão foi realizada com lâmina de bisturi número 15 na região correspondente à face medial da tíbia, em seu terço proximal (Figura 9a). A cortical óssea foi exposta (Figura 9b) e três lojas cirúrgicas em cada tíbia foram realizadas (Figura 9c,d) utilizando brocas cilíndricas sequenciais para implante, medindo 2,0 mm, 2,5 mm e 3,25 mm de diâmetro. Durante todo este procedimento foi mantida irrigação abundante com cloreto de sódio a 0,9% (Figura 9c), visando evitar o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso.

Como padronização, na tíbia direita foram inseridos os implantes dos Grupos 1, 2 e 3, iniciando da porção mais medial para a distal, enquanto que na tíbia esquerda foram inseridos os implantes dos Grupos 4, 5 e 6 (Figura 10). Os implantes foram posicionados sob

pressão até que houvesse fixação desses junto à cortical óssea (Figura 9e).

O tecido muscular e a pele foram suturados com fio de seda (Ethicon/Johnson & Johnson nº4) (Figura 9f) e novamente foi realizada anti-sepsia com álcool iodado. Os animais receberam dose única de antibiótico benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica e diidroestreptomicina base sulfato em ampola de 6.000.000 UI (Pentabiótico – Fort Dodge), por via intramuscular na dose de 1,35 ml/kg. Em seguida, os coelhos foram colocados em gaiolas individuais com ração e água *ad libitum*, e monitorados até o prazo de eutanásia de 1, 2, 4 e 8 semanas. Cada período foi composto de um grupo contendo 4 coelhos.

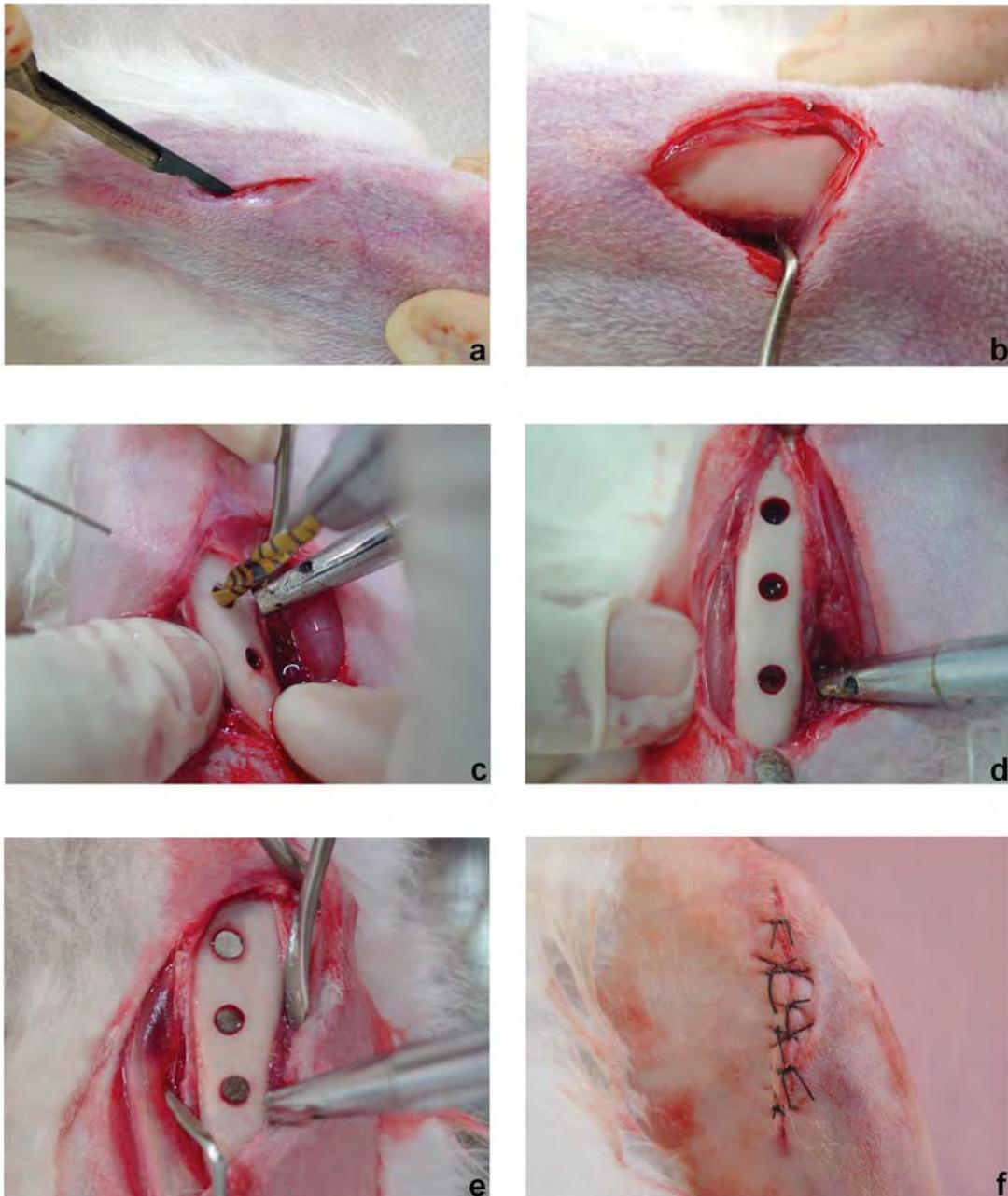


Figura 9 - **Procedimentos cirúrgicos:** a) incisão na face medial da tíbia do coelho; b) exposição da cortical óssea; c) confecção da loja cirúrgica; d) lojas cirúrgicas preparadas para a inserção dos implantes; e) implantes posicionados sob pressão na tíbia; f) sutura do tecido muscular e da pele.

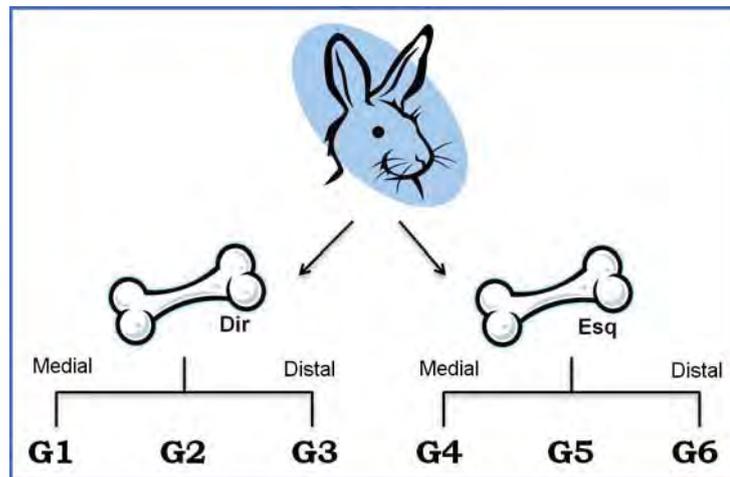


Figura 10 - Esquema do posicionamento dos implantes nas tíbias dos coelhos.

4.4 Análise Histológica da Neoformação Óssea

A análise histológica foi realizada para observar a osseointegração na interface osso-implante, a formação de tecido ósseo para o interior dos poros e a ausência de interface fibrosa, com auxílio de microscópio óptico.

Para o preparo histológico foi utilizada a técnica de desgaste para tecido ósseo não desmineralizado. Inicialmente, o fragmento de tíbia contendo os implantes foi fixado em formol a 10%, por 48 horas. Em seguida, os fragmentos foram segmentados em peças contendo um implante cada (Figura 11a), e novamente fixados em formol a 10%, por mais 48 horas. Após este período, os fragmentos foram lavados abundantemente em água corrente, submetidos a concentrações crescentes de álcool (60%, 70%, 80%, 90% e 100%) para desidratação e imersos em xilol (P.A.), para diafanização. Posteriormente, as peças foram embebidas gradativamente em solução resinosa, utilizando como reagentes o metilmetacrilato (Sigma Aldrich) associado ao dibutilfitalato (Fluka).

Previamente a inclusão dos fragmentos, bases de resina foram preparadas no fundo de vidros âmbar, no intuito de evitar o toque das peças no fundo desses recipientes no momento da inclusão. Essa base resinosa foi preparada a partir da mistura de metilmetacrilato com dibutilfitalato, na proporção de 85% e 15%, respectivamente, acrescentando-se 3 g peróxido de benzoila (Vetec). Os recipientes foram levados para estufa a 37°C, e mantidos por 4 dias até a polimerização dessa solução.

O procedimento de inclusão em resina dos fragmentos de tecido ósseo contendo os implantes foi dividido em 3 fases:

- a) Fase 1: imersão das peças em solução de metilmetacrilato adicionado em dibutilfitalato na proporção de 85% e 15%, respectivamente, por 2 dias, em temperatura ambiente;
- b) Fase 2: imersão das peças na mesma solução da fase 1, acrescentando-se 1 g de peróxido de benzoila, por 2 dias, em geladeira;
- c) Fase 3: as peças foram posicionadas no centro dos vidros âmbar preparados previamente com a base e, sobre elas, foi vertida vagarosamente a solução da fase 1 + 3 g de peróxido de benzoila, até que os fragmentos das tíbias ficassem cobertos em aproximadamente 3 mm. Os recipientes foram tampados e levados para estufa a 37°C e mantidos por 4 dias até o endurecimento total da resina (Figura 11b).

Após o término da inclusão, os vidros utilizados nesse procedimento foram quebrados e o material obtido foi um bloco de resina contendo o fragmento de tibia com o implante (Figura 11c).

Posteriormente, esses blocos de resina foram levados até o aparelho de corte Labcut 1010 (Figura 11d), para que fossem obtidos cortes laminados, no sentido ântero-posterior, utilizando-se disco diamantado de 3 polegadas de diâmetro. Em geral, foram obtidos 3 cortes de cada amostra, medindo cerca de 400 μm .

Estes cortes laminados foram examinadas ao microscópio de luz para escolha do lado a ser fotografado. A superfície escolhida foi delicadamente polida em politriz Labpol 8-12 (Figura 11e) com lixa d'água de granulação 1200 e o acabamento foi realizado com disco de feltro, sílica coloidal e pastas de diamante com granulometria de 1, 3 e 6 μm . A seguir, os cortes foram limpos e a superfície escolhida, colada com éster de cianocrilato (Super Bonder[®]) sobre uma lâmina de plexiglass.

Visando obter maior paralelismo entre a lâmina de plexiglass e a superfície de corte a ser desgastada, uma prensa para a colagem do corte sobre a lâmina foi utilizada, conseguindo-se, dessa maneira, uma fina e uniforme camada de cola. O corte colado sobre a lâmina de plexiglass foi desgastado na politriz utilizando seqüência crescente de lixas d'água (400, 600, 800, 1200) e polido com disco de feltro, sílica coloidal e pastas de diamante. No decorrer do desgaste, os cortes foram observados ao microscópio de luz para a obtenção de uma mínima espessura da cortical com o implante, exibindo o máximo de detalhes.

Por fim, o material foi corado com azul de toluidina (Vetec) (Figura 11f), e os cortes observados em microscópio de luz.



Figura 11 - **Processamento histológico**: a) fragmento de tíbia contendo o implante; b) inclusão do fragmento em solução resinosa, acondicionado em vidro âmbar; c) aspecto final do bloco de resina contendo o fragmento de tíbia com implante inserido (←); d) máquina Labcut para corte de tecido duro; e) máquina politriz para desgaste e polimento dos cortes; f) visão detalhada do corte após colagem em lâmina de plexiglass, desgaste, polimento e coloração com azul de toluidina.

4.5 Análise Histomorfométrica da Neoformação Óssea

Para a análise histomorfométrica, três cortes de cada implante foram selecionados em microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e avaliados quanto à porcentagem de neoformação óssea. Dois campos por corte foram digitalizados, no aumento de 50x, representando a interface medial e distal do implante. Como padronização, as imagens para análise histomorfométrica foram captadas sempre na mesma posição, estando a interface osso-implante posicionada no centro do monitor, no sentido horizontal, e a face externa da cortical encostada na lateral, no sentido vertical.

A seguir, as imagens foram transferidas para um computador, para análise morfométrica das estruturas selecionadas. A taxa de neoformação e crescimento ósseo para o interior dos poros foram calculados utilizando um software, *Image J* (NIH), a partir do qual foi possível construir um retículo com 315 pontos de interseção (21 linhas horizontais e 15 verticais) sobre a imagem obtida (Figura 12). Os pontos que ficaram sobre as áreas de tecido ósseo foram quantificados.

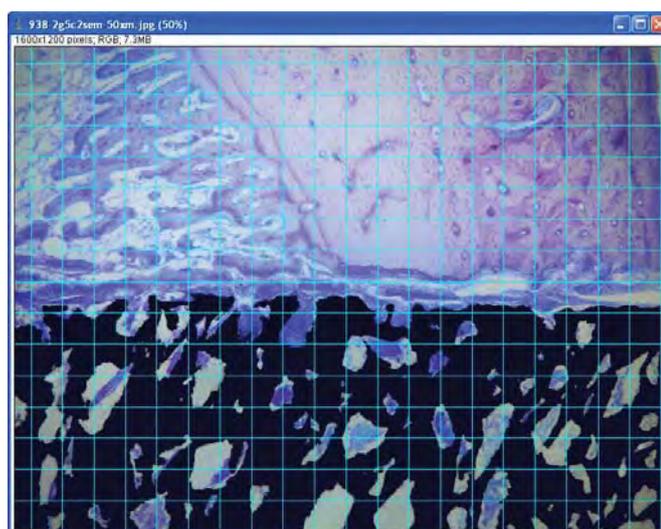


Figura 12 - Retículo, com 315 pontos de intersecção, construído sobre a imagem de microscopia óptica, utilizando o software *Image J*.

Na medida em que foram utilizados dois campos (medial e distal) para cada uma das três secções, a média de pontos, localizados no tecido ósseo de cada amostra, foi dividida por seis.

Após a obtenção da quantidade de pontos de intersecção, a porcentagem de crescimento ósseo foi calculada conforme demonstra a Fórmula a seguir:

$$\text{Total de neoformação óssea (\%)} = \frac{\text{intersecções no tecido ósseo} \times 100}{315}$$

Para a análise dos dados obtidos pela histomorfometria foi utilizado o programa computacional Statistix (versão 8, StatSoft Inc., 2000). Foi realizada a estatística descritiva (média e desvio padrão) e a inferencial, mediante o teste paramétrico ANOVA de medidas repetidas. Foi verificado o efeito interação entre as variáveis experimentais por meio do gráfico de médias e do teste de comparação múltipla de Tukey, com 5% de nível de significância.

5 RESULTADOS

5.1. Análise Metalográfica em MEV

Na análise metalográfica, realizada por MEV, com aumento de 100x, foi possível caracterizar as diferentes amostras de implante confeccionadas (G1, G2 e G3), de acordo com sua morfologia superficial e interna.

Na análise da microtopografia externa, observou-se discreta rugosidade nas amostras densas (Figura 13a), e uma superfície caracteristicamente porosa nos implantes dos demais grupos (Figura 13c,e). Os dois tipos de implantes porosos estudados apresentaram poros com tamanhos e formatos variados, sendo a maioria deles interconectados; fator esse essencial para que houvesse crescimento ósseo para o interior da amostra. Basicamente, foram encontrados dois tipos de poros: os microporos e os macroporos. Os microporos eram pequenos e isolados, oriundos da porosidade residual do processo de sinterização, enquanto que os macroporos eram abertos e interligados, provenientes da porosidade confeccionada pela adição do aditivo orgânico (uréia).

Na análise da microtopografia interna foi possível confirmar a variabilidade no formato dos poros e sua interconexão. Observou-se também a diferença entre os dois tipos de amostras porosas, no que se refere à quantidade de poros (Figura 13d,f). Quanto ao grupo de implantes densos, notou-se a presença de alguns microporos isolados (Figura 13b), oriundos da porosidade residual, a qual é característica do processo de sinterização presente na técnica de metalurgia do pó.

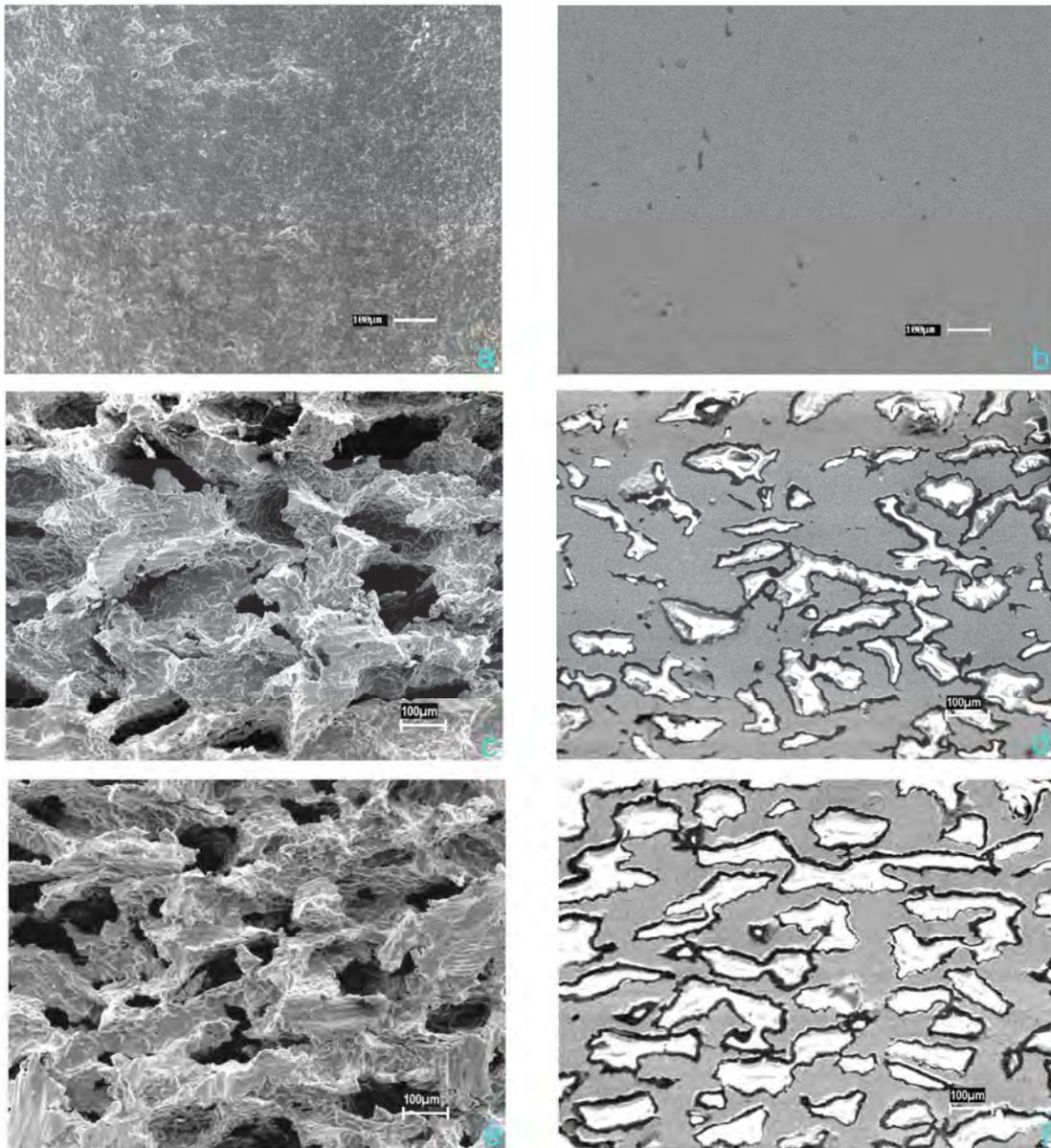


Figura 13 - **Análise metalográfica em MEV, com aumento de 100x**: a) superfície da amostra densa; b) interior da amostra densa; c) superfície da amostra porosa (40%); d) interior da amostra porosa (40%); e) superfície da amostra porosa (50%); f) interior da amostra porosa (50%).

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 (\pm desvio padrão) e mediana dos dados do tamanho de poros (μm)

Implante	n*	Média	Desvio Padrão	Mediana
Grupo 2	5	364,11	$\pm 49,806$	368,41
Grupo 3	5	379,52	$\pm 33,467$	387,37

* número de amostras

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

Implante	n*	Média	Desvio Padrão	Mediana
Grupo 2	5	40,775	$\pm 4,2809$	42,98
Grupo 3	5	51,685	$\pm 4,6418$	53,39

* número de amostras

Para melhor interpretação destes dados metalográficos foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. Com relação à porcentagem de poros foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($k_w = 21,79$; $gl = 1$; $p = 0,0000$). Por outro lado, não foi observada diferença estatística entre o tamanho dos poros ($k_w = 2,29$; $gl = 1$; $p = 0,1323$). Sendo assim, o valor médio de $370 \mu\text{m}$ foi considerado o tamanho dos poros de ambas as amostras.

5.2 Análise por EDS

As amostras de implante submetidas ao tratamento biomimético (G4, G5 e G6), quando avaliadas por EDS, demonstraram principalmente picos de energia característicos dos elementos cálcio (Ca), fósforo (P) e oxigênio (O), além da presença de titânio (Ti) (Figura 14). Enquanto que as amostras não tratadas exibiram apenas o titânio como elemento principal (Figura 15).

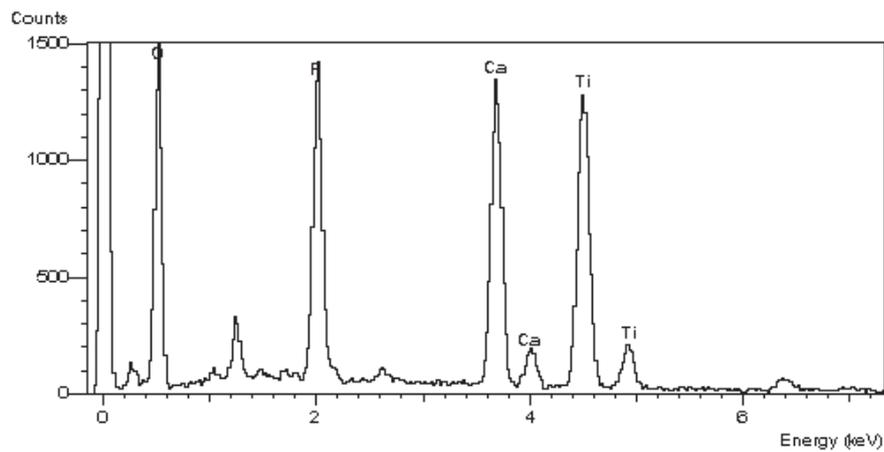


Figura 14 - Espectro EDS da amostra de titânio submetida ao tratamento biomimético, apresentando picos de energia característicos dos elementos Ca e P.

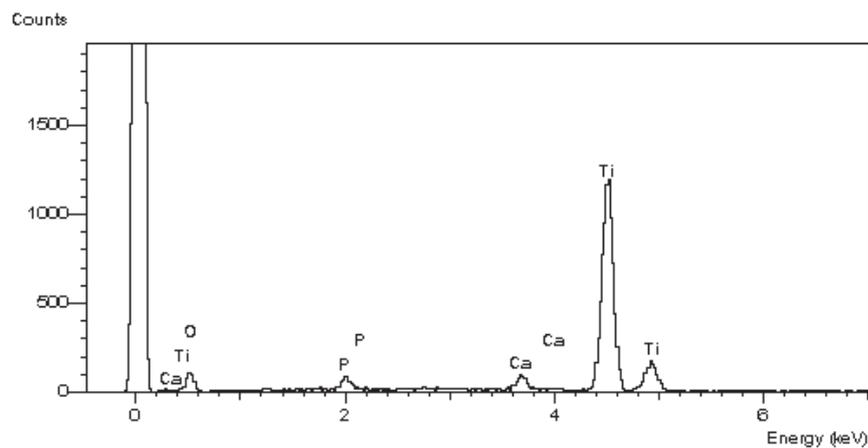


Figura 15 - Espectro EDS da amostra de titânio não tratada, apresentando o Ti como elemento principal.

5.3 Análise Histológica da Neoformação Óssea

Todos os animais apresentaram resultados pós-operatórios satisfatórios, sem qualquer evidência de inflamação ou infecção no sítio cirúrgico. Nenhuma reação adversa foi observada durante este processo.

Macroscopicamente, os implantes de titânio exibiram crescimento ósseo ao redor de sua superfície, em contato com a cortical, independente do tipo, do tempo de sacrifício ou da presença de recobrimento biomimético. No entanto, esse crescimento foi mais exuberante com a progressão do tempo, havendo até, em alguns casos, uma neoformação óssea acima dos implantes, que permaneceram parcial ou totalmente recobertos por osso. O tecido medular apresentou-se com consistência amolecida, exibindo coloração ora amarelada ora avermelhada.

Microscopicamente, as peças avaliadas apresentavam secções transversais das tíbias dos coelhos, onde foram posicionados os implantes de titânio. O osso longo era constituído por tecido ósseo compacto, que formava as paredes da tíbia, e tecido medular, na região central. Este osso compacto exibia numerosos sistemas de Havers, formados por lamelas ósseas concêntricas dispostas em torno de um canal central. Tais lamelas continham lacunas de osteócitos, também dispostas em anéis concêntricos, que se intercomunicavam por canalículos.

No período de eutanásia de 1 semana foi possível observar, em alguns casos, neoformação óssea, evidenciada pela formação de delicadas trabéculas ósseas imaturas na região medular, formadas a partir da proliferação osteoblástica endosteal, em direção a superfície da amostra, independente do grupo avaliado (Figura 16a,b). No entanto, não foi possível verificar neoformação óssea na interface osso-implante (Figura 16c,d), traduzindo-se na ausência de osseointegração neste

período de eutanásia muito curto. Contudo, em todos os grupos, pôde-se notar uma modificação na disposição celular, caracterizada por uma proliferação em direção ao implante, a qual ocorreu principalmente na margem interna da cortical óssea e na região de interface do osso com a superfície da amostra, densa ou porosa.

Por análise qualitativa, ainda no período de 1 semana, nos implantes submetidos ao tratamento biomimético (G4, G5 e G6), notou-se maior proliferação de trabéculas ósseas recém-formadas exibindo aspecto osteóide (Figura 16b). Outra característica importante observada nessas amostras foi a intensa proliferação celular, incluindo células que sugerem o fenótipo osteoblástico em toda superfície do implante na região medular (Figura 16f). Este fato não ocorreu nas amostras sem o tratamento biomimético (Figura 16e).

Nos animais correspondentes ao período de 2 semanas após a cirurgia, pôde-se notar que houve um aumento da proliferação de trabéculas ósseas a partir da face interna da cortical óssea, próxima ao implante, em direção ao mesmo (Figura 17a,b,c,d). Em alguns casos, independente da topografia ou da presença de tratamento biomimético, houve neoformação óssea, sob a forma de trabéculas mais desorganizadas, a partir da margem superior da cortical óssea preexistente, ou seja, da região periosteal. Tais trabéculas apresentavam-se imaturas e não pareciam proliferar em direção a região peri-implantar, como é o caso da neoformação óssea de origem endosteal (Figura 17b). Na interface osso-implante, uma margem de tecido osteóide (Figura 17e) ou de tecido ósseo neoformado, ainda imaturo quanto a sua organização estrutural, pôde ser observado em grande parte das amostras. No caso das amostras porosas, notou-se grande proliferação celular para o interior dos poros, sendo que aqueles que estavam mais preenchidos localizavam-se na periferia dos implantes de titânio. Em alguns poros, mesmo no período de 2 semanas, observou-se início de formação de matriz osteóide.

Os implantes tratados biomimeticamente exibiram maior formação de trabéculas ósseas ao redor da superfície do implante, sendo que algumas amostras desse grupo apresentaram neoformação óssea mais intensa (Figura 17b,d). Tal neoformação por vezes envolveu até mesmo as porções mais apicais da região medular peri-implantar. A proliferação celular para dentro dos poros, no caso dos implantes porosos, também foi maior nas amostras com tratamento de superfície (Figura 17f).

Nos animais eutanasiados após 4 semanas, foi possível observar que o tecido ósseo neoformado na interface osso-implante e na região interna da cortical óssea pré-existente, apresentava-se com um grau de organização e maturação mais avançado do que nos períodos anteriores (Figura 18a,b,c,d). Essa neoformação óssea ao redor dos implantes conduziu à osseointegração dos mesmos (Figura 18a,b,c). No caso das amostras de titânio poroso, pôde-se observar que houve crescimento de tecido ósseo para o interior dos poros (Figura 18e,f), resultando, por vezes, no seu preenchimento parcial (Figura 18f). Os implantes tratados biomimeticamente, nesse período de análise, não exibiram diferença qualitativa significativa com relação ao padrão estrutural da neoformação, em relação às amostras que não foram submetidas a esse tipo de tratamento.

Nos animais que sofreram eutanásia 8 semanas após a cirurgia, notou-se um aumento na neoformação óssea na interface osso-implante, com grande interconexão entre os substratos, confirmando a osseointegração (Figura 19a,b,c,d). Assim como nas amostras referentes a 4 semanas, neste período também não houve diferença qualitativa de neoformação óssea entre os grupos com superfície tratada e não tratada.

Alguns casos, ainda no período de 8 semanas, apresentaram o padrão de remodelação óssea, principalmente na cortical pré-existente. Nessas regiões de remodelação, notaram-se áreas de reabsorção e neoformação óssea, caracterizadas pela presença de

lamelas intersticiais (Figura 19b). Outra característica observada foi que as trabéculas ósseas neoformadas a partir do endóstio se uniram e cresceram em direção a superfície da amostra de titânio, formando uma nova faixa de tecido ósseo abaixo da cortical pré-existente. Além disso, os implantes porosos apresentaram tecido ósseo maduro e organizado no interior de muitos poros (Figura 19e). Tal tecido era altamente celularizado, exibindo diversas lacunas de osteócitos, sendo que foi possível observar a estruturação de um sistema de Havers dentro de um poro (Figura 19f).

Nos grupos que apresentaram neoformação óssea na interface osso-implante, isto é, os animais correspondentes aos períodos de 2, 4 e 8 semanas, foi possível observar nítida delimitação entre o tecido ósseo neoformado e a cortical óssea preexistente (Figura 17a,b; 18a,b,c; 19a,b,c). Esta delimitação foi mais evidente nos grupos com menor tempo de progressão, em virtude da imaturidade e desorganização desse novo tecido nos períodos mais curtos.

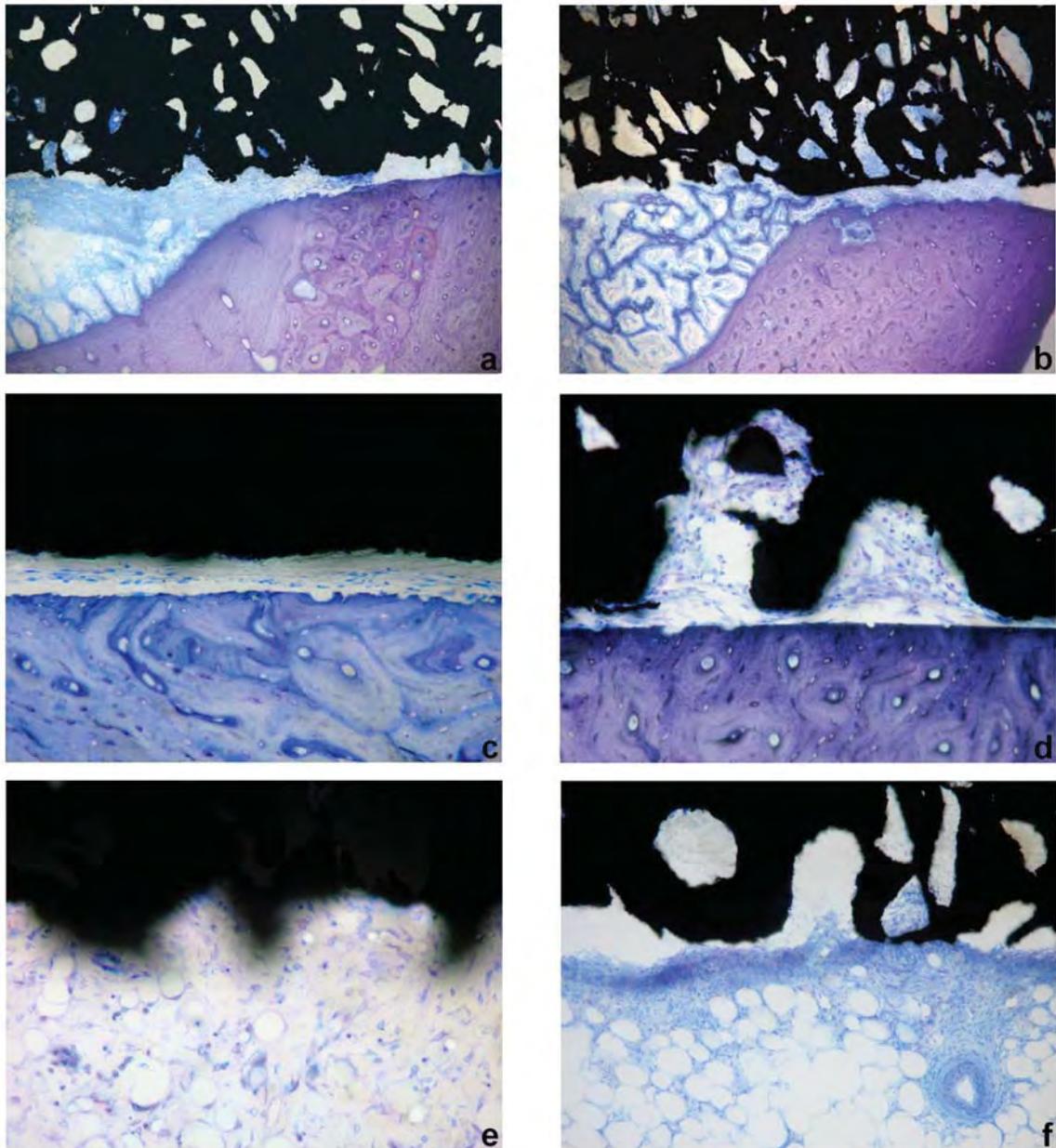


Figura 16 - **Fotomicrografia em microscopia óptica referente ao período de 1 semana:** a) visão panorâmica da interface osso-implante poroso sem TB - 50x; b) visão panorâmica da interface osso-implante poroso com TB - 50x; c) interface osso-implante denso sem TB - 100x; d) interface osso-implante poroso com TB - 100x; e) interface medula-implante denso sem TB - 200x; f) interface medula-implante poroso com TB - 100x.

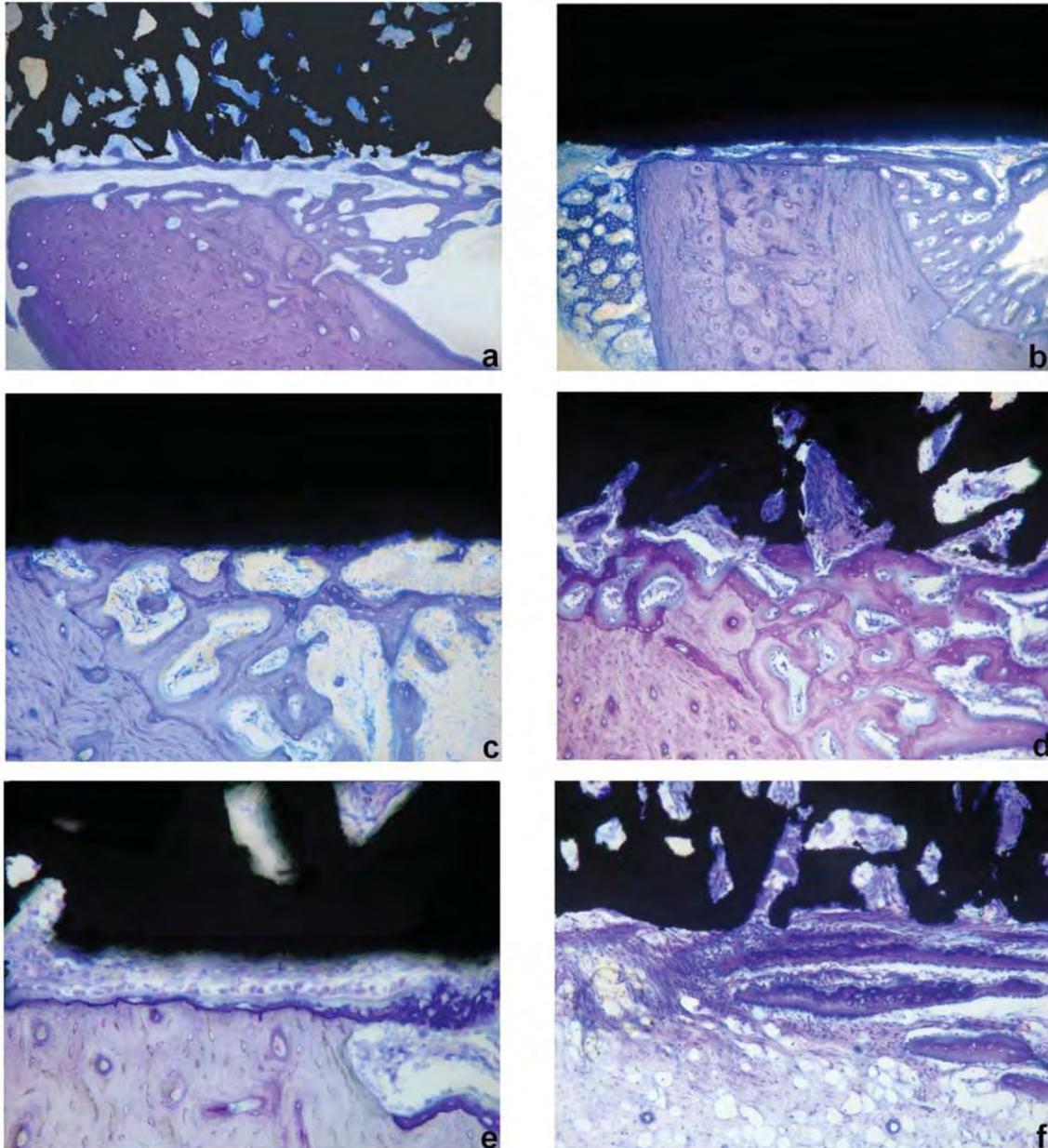


Figura 17 - **Fotomicrografia em microscopia óptica referente ao período de 2 semanas:** a) visão panorâmica da interface osso-implante poroso sem TB - 50x; b) visão panorâmica da interface osso-implante denso com TB - 50x; c) neoformação óssea, de origem endosteal, ao redor de implante denso sem TB - 100x; d) neoformação óssea, de origem endosteal, ao redor de implante poroso com TB - 100x; e) interface osso-implante poroso sem TB - 200x; f) proliferação celular ao redor de implante poroso com TB - 100x.

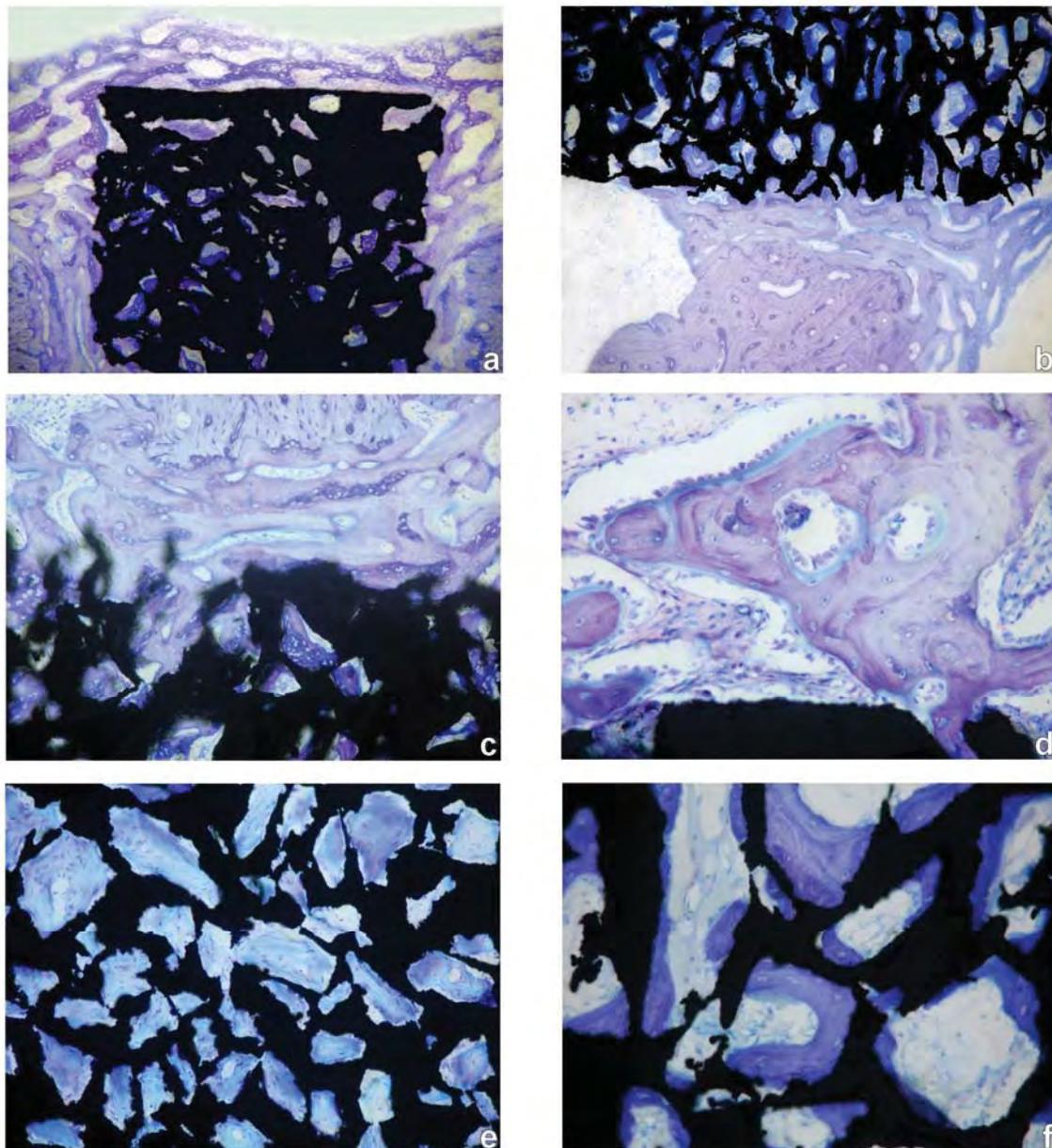


Figura 18 - **Fotomicrografia em microscopia óptica referente ao período de 4 semanas:** a) visão panorâmica da osseointegração de implante poroso com TB - 50x; b) visão panorâmica da interface osso-implante poroso sem TB - 50x; c) osseointegração de implante poroso, com TB, e crescimento de osso para o interior dos poros - 100x; d) trabécula óssea de origem endosteal ao redor de implante poroso com TB - 100x; e) poros preenchidos por tecido ósseo neoformado e imaturo, em amostras com TB - 100x; f) poros parcialmente preenchidos por tecido ósseo maduro, em amostras sem TB - 200x.

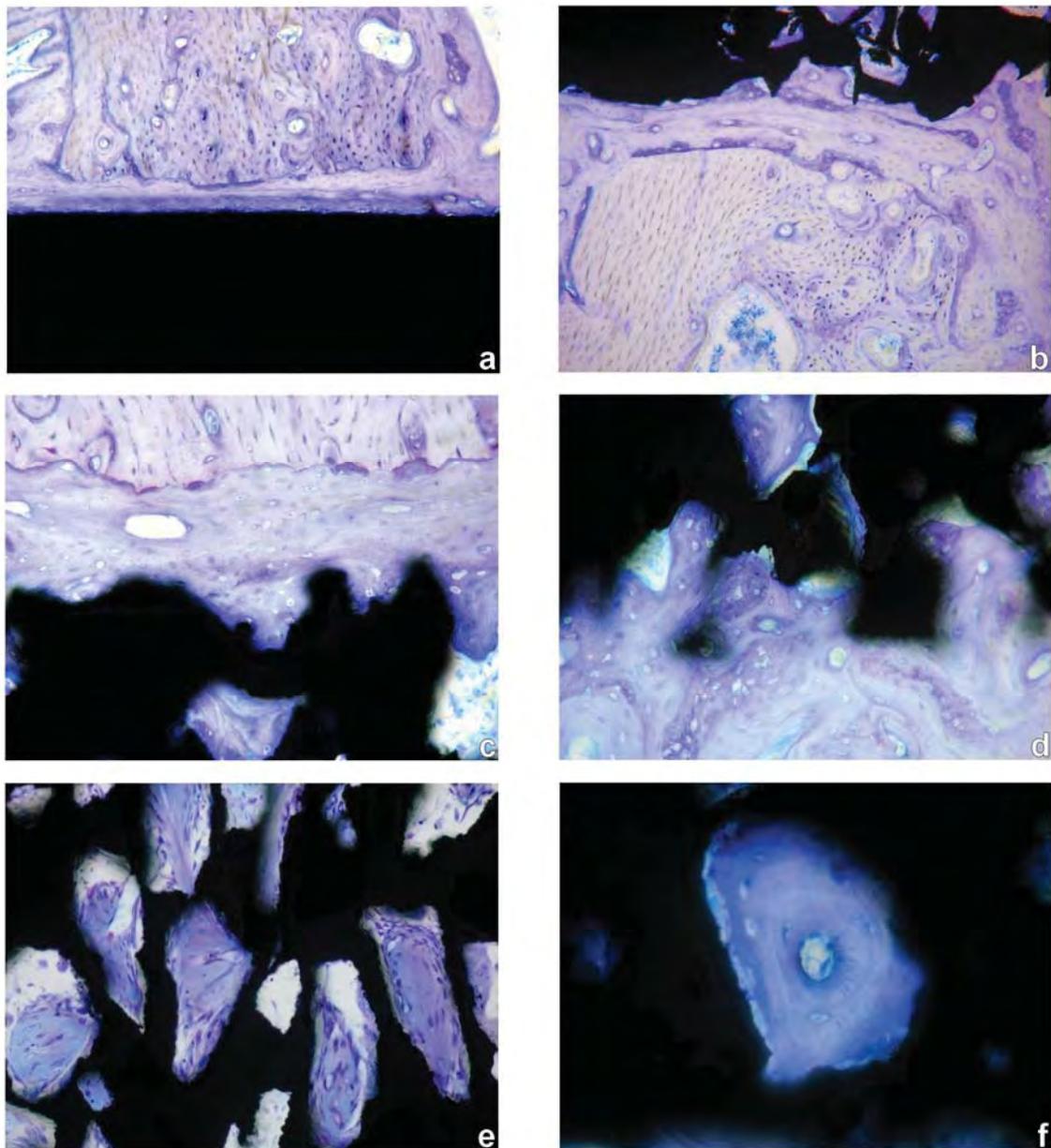


Figura 19 - **Fotomicrografia em microscopia óptica referente ao período de 8 semanas:** a) osseointegração de implante denso com TB - 100x; b) osseointegração de implante poroso sem TB, com áreas de remodelação óssea na cortical pré-existente - 100x; c) interface osso-implante poroso, com TB, e crescimento de osso para o interior de um poro - 200x; d) interface osso-implante poroso, sem TB, e crescimento de osso para o interior dos poros - 200x; e) poros total ou parcialmente preenchidos por tecido ósseo, em amostras com TB - 200x; f) sistema de Havers formado dentro de um poro de amostra sem TB - 200x.

5.4 Análise Histomorfométrica da Neoformação Óssea

A influência dos seis tipos de implante (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) sob quatro diferentes tempos de eutanásia (1, 2, 4 e 8 semanas) sobre a neoformação óssea constitui vinte e quatro condições experimentais a serem estudadas (6 x 4). A estatística descritiva dos mesmos é apresentada na Tabela 3 e representada na Figura 20 mostrada a seguir.

Tabela 3 - Média (\pm desvio padrão) dos dados de neoformação óssea (%) obtidos sob diferentes tipos de implante e ação do tempo de sacrifício

Tipo de Implante (Grupo)	Tempo de Eutanásia (Semanas)			
	1	2	4	8
G1	31,34 \pm 3,96	32,51 \pm 3,78	33,77 \pm 3,03	32,64 \pm 0,99
G2	32,77 \pm 1,55	32,94 \pm 2,30	38,47 \pm 2,49	40,99 \pm 2,17
G3	35,42 \pm 1,33	36,17 \pm 2,59	40,49 \pm 2,89	41,03 \pm 3,07
G4	34,60 \pm 3,74	35,38 \pm 1,10	35,04 \pm 3,50	36,31 \pm 3,24
G5	40,49 \pm 0,76	41,41 \pm 1,37	41,89 \pm 3,09	44,60 \pm 1,98
G6	40,69 \pm 2,68	40,98 \pm 1,54	46,56 \pm 2,24	48,20 \pm 2,37

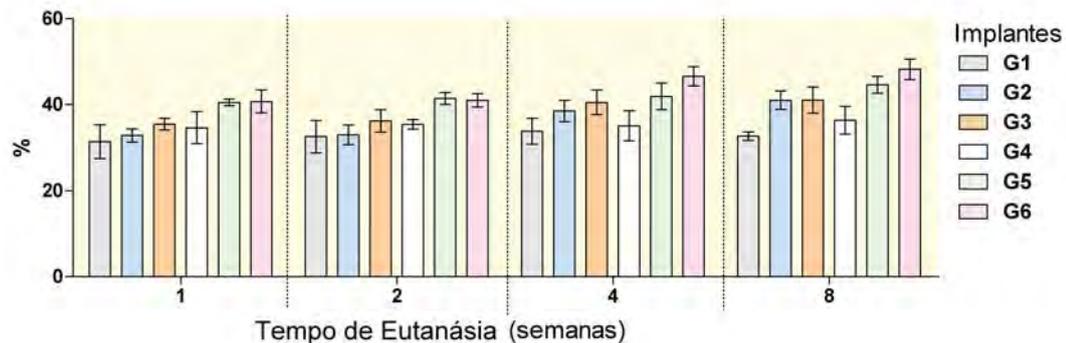


Figura 20 - **Neoformação óssea.** Gráfico de colunas (média±desvio padrão) dos valores de neoformação óssea (%), obtidos sob seis tipos de implantes e quatro tempos de eutanásia (em semanas).

Os dados obtidos na estatística descritiva permitiram concluir que a taxa de neoformação óssea aumentou gradativamente no decorrer dos períodos estudados. Observou-se ainda, que quando os implantes dos grupos G4, G5 e G6, submetidos ao tratamento biomimético, foram comparados, respectivamente, aos implantes dos grupos G1, G2 e G3, nos quatro períodos avaliados, apresentaram maiores valores médios de neoformação óssea.

Para determinar a influência das variáveis: tipo de implante e tempo de eutanásia foi aplicado o teste estatístico ANOVA de dois fatores, representado na Tabela 4 e na Figura 21. A análise revelou que os efeitos tipo de implante e tempo de eutanásia apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Tabela 4 - Resultados do teste estatístico ANOVA de medidas repetidas para os dados de neoformação óssea (%) obtidos em 05 coelhos

EFEITO	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Razão F	P
Implante	5	1498,46	299,693	45,18	0,00001*
TE**	3	366,52	122,172	18,42	0,00001*
Interação	15	168,53	11,235	1,69	0,07150
Erro	72	477,63	6,634		
Total	95	2511,14			

** tempo de eutanásia

* diferença estatisticamente significante

Baseado nos dados da estatística descritiva, quando se considera a influência do tipo de implante, por meio do teste estatístico ANOVA (Tabela 4), pôde-se concluir que os grupos diferem entre si ($p=0,00001$). O efeito dos diferentes tempos de eutanásia, 1, 2, 4 e 8 semanas, sobre a neoformação óssea, também diferem entre si ($p=0,00001$). O efeito interação, não estatisticamente significante ($p=0,07150$), indica que o aumento na quantidade de neoformação óssea, obtida devido ao tipo de amostra nos diferentes períodos, é similar.

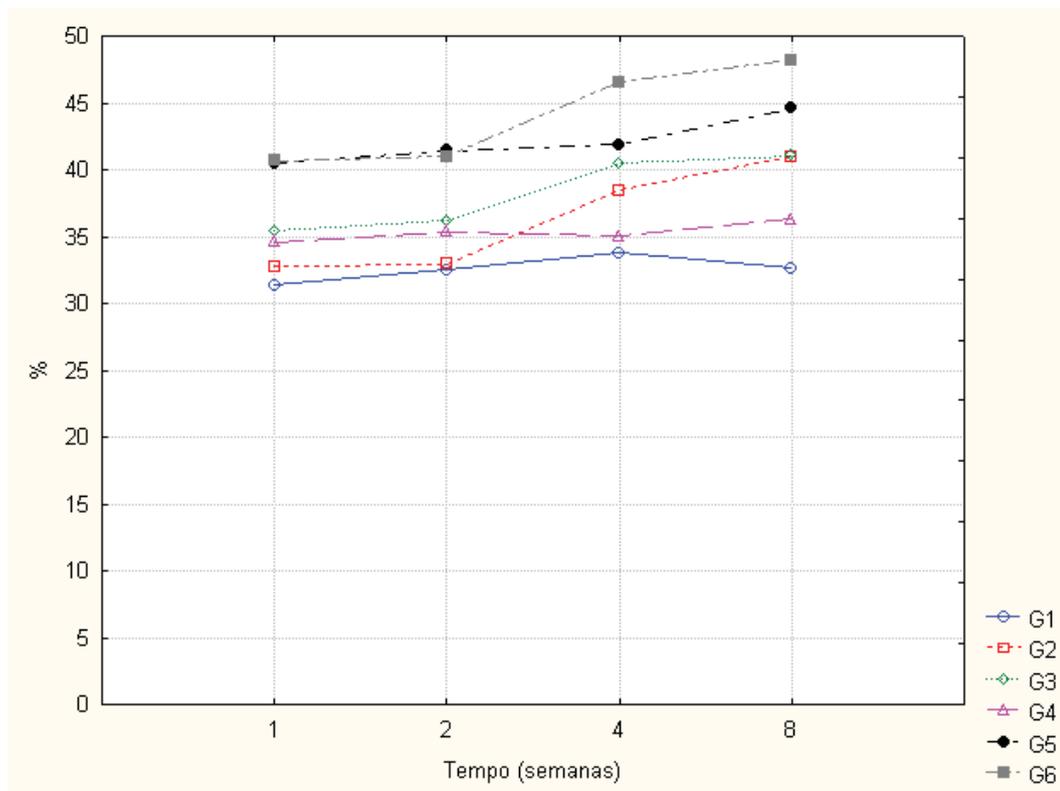


Figura 21 - Gráfico ANOVA dos valores médios de neoformação óssea (%) obtidos segundo as condições experimentais (grupos G1 a G6 nos períodos de 1, 2, 4 e 8 semanas).

Quando se comparou as médias da neoformação óssea considerando o efeito tipo de implante, por meio do teste de Tukey (5%), Tabela 5, verificou-se que as condições que apresentaram maior neoformação óssea foram os grupos G5 e G6, sendo observada diferença estatisticamente significativa com relação aos outros grupos, mas não entre si. Por outro lado, a condição que exibiu menor neoformação óssea foi a amostra do grupo G1, sendo observada diferença estatisticamente significativa com relação aos demais grupos.

Tabela 5 - Resultado do teste de Tukey (5%) para as médias de neoformação óssea (%), sob efeito principal tipo de implante

Amostra	Média	Grupos não homogêneos	
G6	44,106	A*	
G5	42,098	A	
G3	38,278	B	
G2	36,292	B	C
G4	35,332	C	
G1	32,565	D	

* letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

Quando se comparou as médias da neoformação óssea considerando o efeito tempo de eutanásia, por meio do teste de Tukey (5%), Tabela 6, verificou-se que as condições que apresentaram maior neoformação óssea foram nos períodos de 4 e 8 semanas, sendo observada diferença estatisticamente significante com relação aos demais períodos, mas não entre si.

Tabela 6 - Resultado do teste de Tukey (5%) para as médias de neoformação óssea (%), sob efeito principal tempo de eutanásia

Tempo de eutanásia (semanas)	Média	Grupos não homogêneos
8	40,629	A
4	39,369	A
2	36,565	B
1	35,884	B*

* letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

A partir da análise estatística, observou-se que as amostras submetidas ao tratamento biomimético apresentaram maior quantidade de neoformação óssea com relação às amostras não tratadas. Além disso, as amostras porosas também exibiram aumento da proliferação de tecido ósseo quando comparadas às amostras densas. Verificou-se também, que as amostras porosas não tratadas, na maioria das condições, apresentaram maior taxa de proliferação óssea em relação ao grupo de amostras densas submetidas ao tratamento biomimético.

Analisando os dados obtidos, foi possível observar que a condição que exibiu menor quantidade de neoformação óssea foi a amostra densa não tratada (G1), no período de 1 semana. Por outro lado, a condição que demonstrou maior quantidade, foi a amostra com 50% de porosidade submetida ao tratamento biomimético (G6), no período de 8 semanas.

6 DISCUSSÃO

Devido à crescente demanda de pacientes que necessitam de reabilitação por meio de implantes cirúrgicos, muitas pesquisas têm buscado modificações na superfície dos mesmos, que melhorem a neoformação óssea e diminuam o tempo necessário para osseointegração (Deporter et al., 1986; Bowers et al., 1992; Deporter et al., 1996; Piattelli et al., 1998, 1999; Svehla et al., 2000; Nishiguchi et al., 2001; Deporter et al., 2002; Frosch et al., 2002, 2003; Fujibayashi et al., 2004; Habibovic et al., 2004; Kim et al., 2004; Nguyen et al., 2004; Gan et al., 2004; Brentel et al., 2006; Otsuki et al., 2006; Li et al., 2007; Machado, 2008; Vasconcellos et al., 2008a,b; Zhang et al., 2009; Wazen et al., 2010; Coelho et al., 2010; Faria et al., 2010; Vasconcellos et al., 2010a,b; Wazen et al. 2010; Zhao et al., 2010). Considerando os vários fatores que influenciam a osseointegração, a avaliação do maior número possível de parâmetros é desejável para uma melhor compreensão da cicatrização óssea em torno de diferentes superfícies de implantes (Novaes Jr. et al., 2010).

Neste estudo foi avaliada a influência da porosidade, bem como do tratamento biomimético, na osteogênese *in vivo* em implantes de titânio confeccionados pela técnica da metalurgia do pó. Os resultados mostraram que os implantes, independente do tipo, exibiram osseointegração nos períodos de 4 e 8 semanas após a implantação, sendo essa integração mais característica nos períodos mais longos. Além disso, o tratamento biomimético influenciou positivamente o processo de reparação óssea peri-implantar.

Titânio e suas ligas são os materiais metálicos usados com maior frequência na implantodontia, por apresentar adequada propriedade

mecânica, alta resistência a corrosão e biocompatibilidade (Kasemo, 1999; Kasemo, Lausmaa, 1988; Liu et al., 2004). Além disso, devido à camada de óxido de titânio, estes materiais apresentam natureza bioinerte, não induzem resposta imunológica e mostram pouca incidência de toxicidade e rejeição. Estas propriedades tornam o titânio um biomaterial com características satisfatórias para restabelecer a integridade estrutural do tecido ósseo perdido (Steinemann, 1998). No entanto, esse biomaterial não se adere quimicamente ao tecido ósseo, exceto em condições específicas. A fim de se aprimorar essa interconexão, inúmeras modificações na superfície dos implantes têm sido propostas para melhorar a condutividade óssea e/ ou bioatividade do titânio (Liu et al., 2004).

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. Atualmente, 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 (Bobyn et al., 1980; Deporter et al., 1996, Pilliar, 1998; Bram et al., 2000; Deporter et al., 2002; Wei et al., 2002; Frosch et al., 2002, 2003; Brentel et al., 2006; Otsuki et al., 2006; Li et al., 2007; Machado, 2008; Vasconcellos et al., 2008a,b; Zhang et al.,

2009; Faria et al., 2010; Wazen et al., 2010; Vasconcellos et al., 2010a,b). Além disso, no caso de implantes dentais, a utilização da estrutura porosa favorece uma melhor distribuição do crescimento ósseo, mesmo em regiões críticas como na crista óssea marginal, podendo auxiliar na preservação da altura óssea (Faria et al., 2010).

Atualmente, diferentes tecnologias têm sido utilizadas para a obtenção de materiais porosos visando aplicações biomédicas (Marin et al., 2010). Contudo, algumas técnicas convencionais não conseguem produzir poros interligados. Estas estruturas complexas com o formato de rede e aspecto tridimensional interligado em toda a sua espessura são geralmente produzidas por procedimentos específicos tais como a metalurgia do pó (Deporter et al., 1996; Pilliar, 1998; Bram et al., 2000; Wen et al., 2001; Brentel et al., 2006; Braga et al., 2007; Machado, 2008; Vasconcellos et al., 2008a,b; Medeiros et al., 2008; Wazen et al., 2010; Faria et al., 2010; Vasconcellos et al., 2010a,b). Tal técnica 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). Além disso, possui outras vantagens em relação às técnicas convencionais, como a economia de matéria prima, a redução de custo na fabricação e a redução no número de etapas complementares para a produção das amostras (Pilliar, 1998). Neste trabalho, a técnica utilizada para a confecção dos implantes foi a metalurgia do pó, que se mostrou eficaz para a fabricação das amostras idealizadas.

Muitos trabalhos investigaram a influência da porosidade e do tamanho dos poros no comportamento biológico de implantes (Bobyn et al., 1980; Deporter et al., 1986, 1996; Bram et al., 2000; Kim et al., 2000; Deporter et al., 2002; Frosch et al., 2002, 2003; Liang et al., 2003; Brentel et al., 2006; Otsuki et al., 2006; Li et al., 2007; Zhang et al., 2009; Vasconcellos et al., 2008a,b; Faria et al., 2010; Vasconcellos et al., 2010a; Wazen et al., 2010), no entanto, nenhum consenso ainda foi

alcançado no que diz respeito ao seu tamanho ideal (Li et al., 2007). Alguns autores acreditam que a alteração no tamanho e na forma dos poros pode afetar o desenvolvimento do tecido ósseo sobre o implante, uma vez que podem influenciar a proliferação das células ósseas (Boby et al., 1980; Bowers et al., 1992; Frosch et al., 2003). A maioria dos estudos relata uma faixa de tamanho que varia entre 100 e 500 μm (Pilliar, 1998; Nishiguchi et al., 2001; Deporter et al., 2002; Frosch et al., 2003; Barrère et al., 2003; Fujibayashi et al., 2004; Brentel et al., 2006; Li et al., 2007; Machado, 2008; Vasconcellos et al., 2008a,b, 2010a,b; Faria et al., 2010; Zhao et al., 2010). Entretanto, estudos de Nguyen et al. (2004) e de Frosch et al. (2002) relataram, respectivamente, que poros pequenos exibindo apenas 45 μm ou poros grandes com 1000 μm também conseguem promover o crescimento ósseo para o seu interior. No presente estudo, a faixa granulométrica específica de 177 a 250 μm dos grânulos da uréia, permitiu obter o tamanho médio dos poros de 370 μm , estando em acordo com a faixa de tamanho de poros propostos por estudos prévios. Tal valor mostrou-se adequado para permitir a proliferação de células osteogênicas para o interior do implante, aprimorando assim o imbricamento mecânico na interface osso-implante.

Outro aspecto importante com referência aos poros é a porcentagem em que estão presentes na amostra. A estrutura porosa deveria ser produzida com alta porosidade, visando promover espaço suficiente para a adesão e proliferação do novo osso, além do transporte de fluidos corpóreos (Wen et al., 2002). No presente estudo, a variação na quantidade de grânulos de uréia possibilitou confeccionar grupos com porcentagens diferentes de porosidade, como os grupos G2 e G5 que exibiam 40% e os grupos G3 e G6 que apresentavam 50%. Estudos relataram que a porcentagem de porosidade entre 25 e 67% seria ideal para uma amostra porosa (Nishiguchi et al., 2001; Wen et al., 2002; Fujibayashi et al., 2004; Brentel et al., 2006; Li et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008a,b; Zhang et al., 2009; Vasconcellos et al., 2010a,b; Wazen et

al., 2010). Entretanto, amostras com porosidade de 5% e 80% também foram produzidas e promoveram resultados satisfatórios como os observados por Wen et al. (2002) e Kim et al. (2004), respectivamente.

Adicionalmente, a interconexão dos poros também representa um importante papel na reparação peri-implantar, afetando diretamente na osteocondução (Deporter et al., 1996; Barreré et al., 2003; Fujibayashi et al., 2004; Gan et al., 2004; Otsuki et al., 2006; Li et al., 2007; Faria et al., 2010; Zhao et al., 2010). Poros interconectados tridimensionalmente com aspecto de rede permitem a difusão de sangue, células com fenótipo osteoblástico e posterior formação óssea para o interior do implante (Li et al., 2007; Zhang et al., 2009). Estes fatores conduzem ao imbricamento mecânico e à interdigitação do implante com o tecido ósseo, promovendo melhor resistência interfacial em um menor período de tempo, além de proporcionar maior área de contato osso-implante e contribuir na estabilidade a longo prazo (Pilliar, 1998; Otsuki et al., 2006; Li et al., 2007; Vasconcellos et al., 2008a; Brentel et al., 2006; Zhang et al., 2009; Faria et al., 2010; Vasconcellos et al., 2010a,b; Wazen et al., 2010). O referido formato de rede tridimensional foi observado nas amostras utilizadas nesse estudo, já que as imagens obtidas por MEV revelaram a intercomunicação dos poros.

Embora o aumento da porosidade e do tamanho dos poros seja preferencial para facilitar o crescimento ósseo em implantes de titânio, deve-se ter ciência de que esse aumento também conduzirá à alteração das propriedades mecânicas. Assim, dependendo da aplicação pretendida, um equilíbrio entre as propriedades mecânicas e o desempenho biológico deve ser encontrado (Li et al., 2007).

Independente da topografia do implante de titânio, a bioatividade desta superfície não é grande o suficiente para promover o crescimento de tecido ósseo em um curto período de tempo, uma vez que o titânio é um material bioinerte (Ong, Lucas, 1998; Piattelli et al., 1998; Feng et al., 2002; Liu et al., 2004; Zhang et al., 2009). Diferentemente, um

material bioativo permite uma resposta biológica acelerada e específica na interface com o tecido vivo. Neste caso, o tecido ósseo é capaz de interagir intimamente com o biomaterial, depositando-se diretamente sobre sua superfície, sem a intervenção de tecido fibroso.

A busca por melhores resultados celulares, teciduais e clínicos, vem conduzindo os pesquisadores a modificarem cada vez mais as superfícies dos implantes. Procedimentos de modificação química promovem uma alternativa ou um método adicional para as alterações físico-químicas e topográficas dos materiais. As modificações químicas da superfície se utilizam dos conhecimentos atuais da biologia e bioquímica celular para melhorar a função e diferenciação das células, além de otimizar os mecanismos de adesão celular ao substrato. O objetivo destas alterações das superfícies é imobilizar proteínas, enzimas ou peptídeos sobre os biomateriais, visando induzir especificamente respostas celulares e teciduais.

Neste sentido, diferentes técnicas de recobrimentos estão sendo propostas para promover interações da composição química dos implantes com os tecidos e células. Vários estudos têm sugerido ou demonstrado uma aceleração no processo de reparação óssea peri-implantar e maior osteocondutividade nos implantes de titânio que foram submetidos a tratamentos químico-térmicos (Piattelli et al., 1999; Kim et al., 2000; Nishiguchi et al., 2001; Wei et al., 2002; Barrère et al., 2003; Fujibayashi et al., 2004; Gan et al., 2004; Habibovic et al., 2004; Vasudev et al., 2004; Costa et al., 2005; Machado, 2008; Zhang et al., 2009; Zhao et al., 2010). Estes tratamentos são processos específicos capazes de formar, *in vitro*, fosfatos de cálcio, como por exemplo, a hidroxiapatita, na superfície dos implantes, influenciando positivamente o contato osso-implante (Baker et al., 2006). A adição desses revestimentos bioativos à superfície de implantes metálicos têm demonstrado uma melhora significativa na integração com o tecido ósseo, aumentando assim a estabilização mecânica *in situ* (Gan et al., 2004).

A técnica do tratamento biomimético promove o recobrimento do metal com fosfatos de cálcio por meio de imersão do material em FCS contendo concentrações de íons similares aos dos fluidos extracelulares (Kokubo et al., 1996; Kokubo, 1998; Andrade et al., 2000, 2002; Barrère et al., 2003; Habibovic et al., 2004; Liang et al. 2003; Ohtsuki et al., 2007; Medeiros et al., 2008). As vantagens dessa técnica em comparação a outros processos de revestimento são a baixa temperatura de processamento, uma vez que o titânio é sensível ao calor, a produção de cristais bioativos de apatita, semelhantes aos do osso, e sua boa adesão com o substrato. Além disso, o processo biomimético é um método simples e econômico, que apresenta efetividade mesmo em superfícies complexas, sem afetar sua morfologia (Habibovic et al., 2004; Vasudev et al., 2004).

A metodologia utilizada para o desenvolvimento do processo biomimético deste estudo foi baseada no trabalho prévio de Andrade et al. (2000), o qual utilizava pré-tratamento químico/térmico. Este pré-tratamento visa produzir sobre a camada passiva do óxido de titânio, uma superfície mais favorável e ativa para induzir a precipitação de apatita. Posteriormente, as amostras eram imersas em FCSm por 14 dias, promovendo a nucleação e crescimento de uma densa camada de fosfato de cálcio na superfície dos implantes, por meio de consumo de Ca e P da solução. Recentemente, Medeiros et al. (2008) avaliaram a possibilidade de aumentar a bioatividade da superfície dos implantes porosos de titânio, utilizando o processo de precipitação de fosfato de cálcio, após a imersão em FCSm em diferentes tempos, porém sem a realização do pré-tratamento químico/térmico. No entanto, apenas amostras imersas por 28 dias apresentaram picos elevados desses íons, compatíveis com a hidroxiapatita. No presente estudo, foi utilizado o método proposto por Andrade et al. (2000) já que o pré-tratamento diminui o tempo necessário de imersão das amostras no FCSm para a formação do revestimento bioativo.

O sucesso do tratamento biomimético nas amostras deste trabalho foi confirmado utilizando o EDS, o qual revelou a presença de Ca e P nas amostras submetidas ao recobrimento. Esta análise também foi empregada em estudos prévios que realizaram o tratamento biomimético (Andrade et al., 2000, 2002; Feng et al., 2002; Liang et al., 2003; Costa et al., 2005).

Diversos autores avaliaram a resposta osteogênica frente a diferentes superfícies de titânio e concluíram que os melhores resultados de cicatrização óssea, bem como de fixação mecânica, foram encontrados nos implantes com superfície porosa associada com recobrimento bioativo (Svehla et al., 2000; Nishigushi et al., 2001; Barrère et al., 2003; Fujibayashi et al., 2004; Gan et al., 2004; Habibovic et al., 2004; Vasudev et al., 2004; Machado, 2008; Zhao et al., 2010). Dentre as razões que justificam estes resultados, está o fato de que aplicações de revestimentos cerâmicos sobre superfícies porosas incentivam a rápida osteocondução do tecido ósseo adjacente e permitem a ligação química direta entre os substratos, logo após a implantação (Vasudev et al., 2004).

Por outro lado, Fontana et al. (2010) ao analisarem os efeitos do revestimento de fosfato de cálcio na osseointegração de implantes inseridos em fêmur e tíbia de coelhos, não encontraram diferença estatisticamente significativa entre a superfície porosa com e sem recobrimento, nos períodos de 2, 4 e 9 semanas. Os autores não observaram nenhuma evidência histológica de que o revestimento de fosfato de cálcio promoveu uma aposição óssea ativa sobre a superfície do implante na região do espaço medular. Estes resultados estão em contraste aos encontrados neste estudo e na maioria das pesquisas prévias citadas anteriormente. Contudo, segundo Fontana et al. (2010), a discrepância desses resultados em comparação à literatura pode ser devido a vários fatores, como a técnica cirúrgica empregada ou ainda as propriedades de superfície dos implantes utilizados.

Além da topografia dos implantes e da sua composição química, a qualidade do tecido ósseo do sítio de implantação, a técnica cirúrgica utilizada, a carga aplicada ao implante, os métodos de esterilização e os fatores relacionados ao posicionamento deste na loja cirúrgica, como sua estabilidade e grau de micro-movimento, são características que também interferem no resultado final da osseointegração (Albrektsson et al., 1981; Branemark, 1983; Feng et al., 2002; Fontana et al., 2010).

Neste estudo, a maioria destes aspectos foi considerada para que a interação osso-implante fosse obtida com sucesso. Inicialmente todos os implantes utilizados foram, previamente à sua inserção, esterilizados por energia ionizante. A tíbia do coelho foi utilizada como sítio de implantação, e segundo Branemark (1983) e Wazen et al. (2010), este é um modelo de animal adequado para a observação do processo de osseointegração. A utilização do coelho como modelo experimental também tem sido sugerido por outros autores como um instrumento valioso para selecionar e avaliar características de superfície de implantes, antes da condução desses estudos em humanos (Piattelli et al., 1998; Gan et al., 2004; Costa et al., 2005; Vasconcellos et al., 2008a,b; Zhang et al. 2009; Fontana et al., 2010; Vasconcellos et al., 2010a,b). Para o preparo das lojas cirúrgicas nas tíbias dos coelhos foram realizadas perfurações com brocas de diâmetros progressivos, com o mínimo de injúria ao tecido ósseo circunjacente, e mantendo-se irrigação constante com solução de cloreto de sódio a 0,9%. Posteriormente, os implantes foram posicionados nas lojas ósseas por meio de pressão digital, obtendo-se estabilidade primária. Além disso, não foi aplicada carga imediata a esses implantes.

O processo de cicatrização peri-implantar começa imediatamente após a inserção do implante na loja cirúrgica. A fase inicial desse fenômeno depende da resposta primária do hospedeiro frente ao material estranho e envolve adsorção de proteínas, ativação plaquetária,

formação de coágulo, resposta inflamatória e formação de tecido ósseo imaturo (Kuzyk, Schemitsch, 2011). Este processo pode ser influenciado pela topografia de superfície e presença de recobrimento bioativo, os quais são importantes fatores para o sucesso da cicatrização. Logo, o tipo de superfície pode prover melhores condições para adsorção de proteínas, estabilização do coágulo e osteocondução de células com fenótipo osteogênico em direção à superfície do implante, facilitando e aprimorando o processo de cicatrização na interface osso-implante (Davies, 2007; Kuzyk, Schemitsch, 2011).

No entanto, apesar da influência das diferentes superfícies dos implantes na cicatrização, a sequência de reparo da ferida cirúrgica é similar (Coelho et al., 2010). Embora, neste presente estudo tenha sido observada distribuição mais uniforme de tecido ósseo neoformado nos implantes de superfície porosa com revestimento bioativo. Este resultado provavelmente ocorreu devido a manutenção mais eficaz do coágulo sanguíneo, o qual pode alterar potencialmente a cinética local de cicatrização óssea.

Uma vez que as alterações na superfície dos implantes podem influenciar diretamente na resposta de cicatrização óssea, muitas pesquisas têm avaliado histologicamente o comportamento celular e tecidual (Deporter et al., 1986; Piattelli et al., 1998, 1999; Nishiguchi et al., 2001; Deporter et al., 2002; Barrère et al., 2003; Fujibayashi et al., 2004; Habibovic et al., 2004; Vasudev et al., 2004; Costa et al., 2005; Otsuki et al., 2006; Li et al., 2007; Machado, 2008; Vasconcellos et al., 2008a,b; Zhang et al., 2009; Coelho et al., 2010; Faria et al., 2010; Fontana et al., 2010, Vasconcellos et al., 2010a; Wazen et al., 2010; Zhao et al., 2010). Neste estudo, a resposta osteogênica foi realizada em períodos curtos de cicatrização, 1 e 2 semanas, e períodos longos, 4 e 8 semanas. Na análise histológica dos tempos mais curtos, notou-se maior proliferação celular em direção à região peri-implantar e neoformação óssea mais exuberante, sob a forma de trabéculas recém formadas, de origem

endosteal, nas amostras tratadas. Nos períodos de 4 e 8 semanas, ocorreu proliferação de tecido ósseo ao redor e para o interior dos poros dos implantes, conduzindo à osseointegração dos mesmos. Nestes tempos de sacrifício mais longos, não foi observada diferença qualitativa em relação à neoformação óssea quando as amostras tratadas e não tratadas foram comparadas. Devido à técnica de processamento histológico, foi possível notar a medula óssea altamente celularizada, sugerindo aspecto de normalidade ao processo de cicatrização, além de células ósseas como osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, indicando uma remodelação constante.

Com relação à taxa de neoformação óssea na interface osso-implante, diversos estudos demonstraram neoformação variando de 25 a 100% da área total disponível para contato (Deporter et al., 1986; Nishigushi et al., 2001; Deporter et al., 2002; Barrère et al., 2003; Vasudev et al., 2004; Costa et al., 2005; Brentel et al., 2006; Machado, 2008; Vasconcellos et al., 2008a; Zhang et al., 2009; Vasconcellos et al., 2010a; Wazen et al., 2010; Zhao et al., 2010). No presente estudo, os resultados de neoformação óssea independente do tipo de implante, exibiram valores satisfatórios, já que a taxa variou de 31,34% a 48,2%. Em todos os períodos, as amostras porosas apresentaram maior neoformação óssea quando comparadas com as densas. Em relação ao recobrimento biomimético, a porcentagem de neoformação óssea apresentou maior desempenho na sua presença. No entanto, qualitativamente este tratamento não promoveu diferença no tecido ósseo nos períodos mais longos, 4 e 8 semanas, apesar de ter sido observada diferença quantitativa.

Os valores encontrados na análise histomorfométrica podem ser considerados satisfatórios em relação aos trabalhos prévios (Costa et al., 2005; Brentel et al., 2006; Vasconcellos et al., 2008a, Zhang et al., 2009; Wazen et al., 2010; Zhao et al., 2010). Este fato pode ser resultado dos períodos curtos de eutanásia, uma e duas semanas. No entanto, a

principal razão destes valores pode ter sido decorrente do método de análise histomorfométrica utilizado, o qual permitiu a avaliação de um amplo campo de estudo, selecionado em microscópio de luz com aumento de 50x. A escolha desse aumento foi impulsionada pela grande neoformação óssea proveniente da região endosteal, principalmente nas amostras tratadas. O aumento de 100x permitiria avaliar apenas a região de interface entre o implante e a cortical óssea, ou seja, a região medular próxima ao endóstio, não seria abordada nesta amplitude, prejudicando a análise histomorfométrica para as condições deste estudo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência das alterações na superfície dos implantes na resposta osteogênica. Baseado nos resultados encontrados sugere-se que a topografia de superfície dos implantes e a presença de recobrimento biomimético desempenham um importante papel na resposta do tecido ósseo. A maior área para o contato osso-implante, proporcionada pela complexa rede de poros, permitiu maior neoformação de osso. Além disso, a presença de recobrimento bioativo influenciou positivamente a proliferação celular peri-implantar e o crescimento de tecido ósseo, principalmente nos períodos iniciais de cicatrização, sugerindo uma aceleração no processo de osseointegração. Sendo assim, tais resultados podem constituir um subsídio considerável para o possível desenvolvimento de um implante a ser utilizado na clínica cirúrgica, que apresente condições mais favoráveis à osseointegração, diminuindo assim o período de tratamento.

7 CONCLUSÃO

Diante destes resultados pôde-se concluir que implantes porosos exercem melhor influência sobre o comportamento celular *in vivo*. Além disso, concluiu-se também que o tratamento biomimético favorece a neoformação óssea durante todos os períodos da cicatrização. Desta forma, um implante com alta porosidade associado a um recobrimento bioativo torna-se um biomaterial promissor para a engenharia de tecidos duros.

8 REFERÊNCIAS*

Abe Y, Kobubo T, Yamamuro T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilising a biological process. *J Mater Sci Mater Med*. 1990 Nov; 1(4):233-8.

Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981;52:155-70.

Andrade MC, Sader MS, Filgueiras MR, Ogasawara T. Microstructure of ceramic coating on titanium surface as a result of hydrothermal treatment. *J Mater Sci Mater Med*. 2000 Nov;11(11):751-5.

Andrade MC, Filgueiras MRT, Ogasawara T. Hydrothermal nucleation of hydroxyapatite on titanium surface. *J Eur Ceramic Soc*. 2002;22:505-10

Baker KC, Anderson MA, Oehlke SA, Astashikina AI, Haikio DC, Drelich J, et al. Growth, characterization and biocompatibility on bone-like calcium phosphate layers biomimetically deposited on metallic substrate. *Mater Sci Eng*. 2006;26:1351-60.

Barrère F, van der Valk CM, Meijer G, Dalmeijer RAJ, Groot K, Layrolle P. Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2003 Oct;67(1):655-65.

Bobyn JD, Pilliar RM, Cameron HU, Weatherly GC. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clin Orthop*. 1980;(150):263-70.

* 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

Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992 Fall;7(3):302-10.

Braga NA, Ferreira NG, Cairo CAA. Porous titanium production and porosity control by powder metallurgy. *Quim Nova*. 2007 Mar-Apr;30(2):450-7.

Bram, M et al. High-porosity titanium, stainless steel, and superalloy parts. *Adv Eng Mater*. 2000 Jan;2(4):196-9.

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

Brentel AS, Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça MLAG, Vasconcellos LGO, Cairo CAA, et al. Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *J Oral Applied*. 2006;14(3):213-8.

Brunski JB, Puleo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: Current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000;15:15-46.

Coelho PG, Granato R, Marin C, Bonfante EA, Janal MN, Suzuki M. Biomechanical and bone histomorphologic evaluation of four surfaces on plateau root form implants: An experimental study in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(5):e39-e45.

Costa Ca, Sena LA, Pinto M, Muller CA, Cavalcanti JH. In vivo characterization of titanium implants coated with synthetic hydroxyapatite by electrophoresis. *Braz Dent J*. 2005;16:75-81.

Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*. 2003;67(8):932-49.

Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomater*. 2007 Dec; 28(34):5058-67.

Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Melcher AH, Winslow J, Howley TP, et al. A histological assessment of the initial healing response adjacent to porous-surfaced, titanium alloy dental implants in dogs. *J Dent Res*. 1986 Aug;65(8):1064-70.

Deporter DA, Watson PA, Pilliar RM, Pharoah M, Smith DC, Chipman M, et al. A prospective clinical study in humans of an endosseous dental implant partially covered with a powder-sintered porous coating: 3- to 4-year results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996 Jan-Feb;11(1):87-95.

Deporter D, Todescan R, Riley N. Porous-surfaced dental implants in the partially edentulous maxilla: assessment for subclinical mobility. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002 Apr;22(2):184-92.

Ellingsen JE. Surface configurations of dental implants. *Periodontol* 2000. 1998;17:36-48.

Faria PEP, Carvalho AL, Felipucci DNB, Wen C, Sennerby 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.

Feng B, Chen JY, Qi SK, He L, Zhao JZ, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and bioactivity. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 May;13(5):457-64.

Fontana F, Rocchietta I, Addis A, Schupbach P, Zanotti G, Simon M. Effects of a calcium phosphate coating on the osseointegration of endosseous implants in a rabbit model. *Clin Oral Impl Res*. 2010 Dec; doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02056.x. [Epub ahead of print]

Frosch KH, Barvencik F, Lohmann CH, Viereck V, Siggelkow H, Breme J, et al. Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants. *Cells Tissues Organs*. 2002;170(4):214-27.

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 Mar;21(2):213-23.

Fujibayashi S, Neo M, Kim HM, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(3):443-50.

Gan L, Wang J, Tache A, Valiquette N, Deporter D, Pilliar R. Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity Part II: short-term in vivo studies. *Biomaterials*. 2004;25:5313-21.

Habibovic P, van der Valk CM, van Blitterswijk CA, De Groot K, Meijer G. Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2004 Apr;15(4):373-80.

Ilan DI, Ladd AL. Bone Graft Substitutes. *Oper Techn Plastic Recons Surg*. 2002;9(4):151-60.

Jones FH. Teeth and bone: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. *Surf Sci Rep*. 2001;42:75-205.

Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surface: a surface science approach. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988;3:83-101.

Kasemo B. Biocompatibility of titanium implant surfaces: a surface science approach. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(4):510-5.

Kim HM, Kokubo T, Fujibayashi S, Nishiguchi S, Nakamura T. Bioactive macroporous titanium surface layer on titanium substrate. *J Biomed Mater Res*. 2000 Dec;52(3):553-7.

Kim HK, Jang JW, Lee CH. Surface modification of implant materials and its effect on attachment and proliferation of bone cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2004;15:825-30.

Kokubo T, Miyaji F, Kim HM. Spontaneous formation of bonelike apatite layer on chemically treated titanium metals. *J Am Ceram Soc.* 1996;79(4):1127-9.

Kokubo T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta Materialia.* 1998;46(6):2519-27.

Kuzyk PR, Schemitsch EH. The basic science of peri-implant bone healing. *Indian J Orthop.* 2011;45(2):108-15.

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

Liang F, Zhou L, Wang K. Apatite formation on porous titanium by alkali and heat-treatment. *Surf Coat Tech.* 2003 Sept;165:133-9.

Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng.* 2004;47:49-121.

Machado ACP. Biocompatibilidade in vivo de implantes de titânio submetidos ao processo biomimético [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos: UNESP - Univ Estadual Paulista; 2008.

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.

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

Nguyen HQ, Deporter DA, Pilliar RM, Valiquette N, Yakubovich R. The effect of sol-gel-formed calcium phosphate coatings on bone ingrowth and osteoconductivity of porous-surfaced Ti alloy implants. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(5):865-76.

Nishiguchi S, Kato H, Neo M, Oka M, Kim HM, Kokubo T, et al. Alkali- and heat-treated porous titanium for orthopedic implants. *J Biomed Mater Res*. 2001 Feb;54(2):198-208.

Novaes Jr. AB, Souza SLS, Barros RRM, Pereira KKY, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J*. 2010;21(6):471-81.

Ohtsuki C, Kamitakahara M, Miyazaki T. Coating bone-like apatite onto organic substrates using solutions mimicking body fluid. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Jan-Feb;1(1):33-8.

Ong JL, Lucas LC. Auger electron spectroscopy and its use for the characterization of titanium and hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials*. 1998;19:455-64.

Otsuki B, Takemoto M, Fujibayashi S, Neo M, Kokubo T, Nakamura T. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials*. 2006;27:5892-900.

Piattelli A, Manzon L, Scarano A, Paolantonio M, Piattelli M. Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998 Nov-Dec;13(6):805-10.

Piattelli A, Scarano A, Di Alberti L, Piattelli M. Bone-hydroxyapatite interface in retrieved hydroxyapatite-coated titanium implants: a clinical and histologic report. *Int J Oral Maxillofac Impl*. 1999;14:233-8.

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.

Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*. 1999;20:2311-21.

Steinemann SG. Titanium--the material of choice? *Periodontol* 2000. 1998 Jun;17:7-21.

Svehla M, Morberg P, Zicat B, Bruce W, Sonnabend D, Walsh WR. Morphometric and mechanical evaluation of titanium implant integration: comparison of five surface structures. *J Biomed Mater Res*. 2000 Jul; 51(1):15-22.

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;19:2851-7.

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.

Vasconcellos LMR, Leite DO, Nascimento FO, Carvalho YR, Cairo CAA. Evaluation of bone ingrowth into porous titanium implant: histomorphometric analysis in rabbits. *Braz Oral Res*. 2010a;24(4):399-405.

Vasconcellos LMR, Leite DO, Nascimento FO, Vasconcellos LGO, Graça MLA, Carvalho YR, et al. Porous titanium for biomedical applications: An experimental study on rabbits. *Med Oral Patol Cir Bucal*. 2010b;15(2):407-12.

Vasudev DV, Ricci JL, Sabatino CS, Li P, Parsons JR. *In vivo* evaluation of a biomimetic apatite coating grown on titanium surfaces. *J Biomater Res Part A*. 2004; 69A(4):629-36.

Wazen RM, Lefevre LP, Baril E, Nanci A. Initial evaluation of bone ingrowth into a novel porous titanium coating. *J Biomater Res Part B Appl Biomater*. 2010;94:64-71.

Wei M, Kokubo T, Nakamura T. Optimising the biactivity of alkaline treated titanium alloy. *Mat Sci and Engineering*. 2002;20:125-34.

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

Zaffe D. Some considerations on biomaterials and bone. *Micron*. 2005 Sept; 36(7-8):583-92.

Zhang E, Zou C. Porous titanium and silicon-substituted hydroxyapatite biomodification prepared by a biomimetic process: Characterization and in vivo evaluation. *Acta Biomater*. 2009;5:1732-1741.

Zhao CY, Zhun XD, Yuan T, Fan HS, Zhang XD. Fabrication of biomimetic apatite coating on porous titanium and their osteointegration in femurs of dogs. *Mater Sci Eng C*. 2010;30:98-104.

Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, et al. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials*. 2005 May;26(14):1837-47.

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 / aigotti@fosjc.unesp.br / Guedes@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO **Comitê de Ética em Pesquisa** **Envolvendo Animais**

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **017/2010-PA/CEP**, sobre **“Estudo da osseointegração de implantes porosos submetidos ao tratamento biomimético”**, sob responsabilidade de **DANIEL DE OLIVEIRA LEITE**, tendo como orientadora a **Profa Dra. 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, 23 de setembro de 2010

Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora